

Aus dem medizinischen Zentrum für operative Medizin

Klinik für Neurochirurgie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Christopher Nimsky

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

**Expressionsanalyse für die tumorassoziierten Gene IL13R α 2,
OLIG2 und DBCCR1 in diffusen und anaplastischen
Astrozytomen, sowie Glioblastomen und deren Rezidiven**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jens-Martin Kalk

aus Berlin

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 19.05.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund
Referent: Prof. Dr. med. H. Bertalanffy
Korreferent: PD Dr. med. G. Zugmaier

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VI
Summary	IX

1. Einleitung und Grundlagen	1
-------------------------------------	----------

1.1 Thematische Einführung und Fragestellung	1
1.2 Astrozytome	4
1.2.1 Diffus infiltrierende Astrozytome	6
1.2.2 Diffuse Astrozytome (WHO-Grad II)	7
1.2.3 Anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III)	9
1.2.4 Glioblastom (WHO-Grad IV)	11
1.2.5 Symptome	15
1.2.6 Diagnose	16
1.2.7 Therapie	17
1.3 IL13R α 2 (Interleukin-13 Receptor alpha-2)	26
1.4 OLIG2 (Oligodendrocyte transcription factor 2)	29
1.5 DBCCR1 (Deleted in Bladder Cancer Candidate Region 1)	34

2. Material und Methoden	37
---------------------------------	-----------

2.1 Probenmaterial	37
2.2 Geräte und Chemikalien	39
2.2.1 Geräte	39
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	39
2.2.3 Chemikalien und Lösungen	40
2.2.4 Kits	40
2.2.5 Primer	42
2.3 Methoden	43
2.3.1 Theoretische Grundlagen der Methodik	43
2.3.1.1 RNA-Isolierung	44
2.3.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie	45
2.3.1.3 Reverse Transkription	45
2.3.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarosegelelektrophorese	46

2.3.1.5	Real-Time PCR	48
2.3.1.6	Das Prinzip der relativen Quantifizierung	50
2.3.1.7	Primerdesign	54
2.3.2	Die praktische Durchführung	55
2.3.2.1	RNA-Isolierung	55
2.3.2.2	RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie	56
2.3.2.3	Reverse Transkription	57
2.3.2.4	cDNA-Qualitätskontrolle	58
2.3.2.5	Durchführung der Agarosegelelektrophorese	59
2.3.3	Relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR	59
2.3.3.1	Etablierung der Standardkurven	59
2.3.3.2	Messung der Proben	62
2.3.4	Statistische Methoden	64
3.	Ergebnisse	65
3.1	RNA-Isolierung und RNA-Konzentrationsbestimmung	65
3.2	Reverse Transkription und cDNA-Qualitätskontrolle	65
3.3	Etablierung der Standardkurven	66
3.3.1	Standardkurve IL13R α 2	67
3.3.2	Standardkurve OLIG2	68
3.3.3	Standardkurve DBCCR1	69
3.4	Real-Time PCR Ergebnisse	70
3.4.1	IL13R α 2	70
3.4.2	OLIG2	72
3.4.3	DBCCR1	73
4.	Diskussion	75
4.1	Versuchsaufbau	75
4.1.1	Auswahl des Probenmaterials	75
4.1.2	Relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR	77
4.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse	79
4.2.1	IL13R α 2	79
4.2.2	OLIG2	81
4.2.3	DBCCR1	83

4.3 Weiterführende Untersuchungen	84
5. Literaturverzeichnis	85
6. Tabellenanhang	96
7. Verzeichnis der akademischen Lehrer	103
8. Danksagungen	104

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent (von Hundert)
β	beta
Δ	delta
AA	anaplastisches Astrozytom
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired-Immuno-Deficiency-Syndrom
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C _T	Schwellenwertzyklus (Threshold Cycle)
ca.	circa
cDNA	komplementär DNA (complementary desoxyribonucleic acid)
CpG	Cytosin-Guanin-Paar (Cytosine phosphorylated Guanine)
CT	Computertomographie
DA	diffuses Astrozytom
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
GBM	Glioblastom
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
IL	Interleukin
LOH	Loss of heterozygosity, Verlust eines Allels durch dessen heterozygote Deletion
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MRT	Magnetresonanztomographie
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
rGBM	Rezidivglioblastom

RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleid acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
z.B.	zum Beispiel

Maßeinheiten

Da	Dalton
g	Gramm
Gy	Gray
l	Liter
m	Meter
M	Molar (Mol pro Liter)
min.	Minute
sec.	Sekunde
V	Volt

Dezimalvorsätze

k	kilo-, 10^3
c	centi-, 10^{-2}
m	milli-, 10^{-3}
μ	mikro-, 10^{-6}
n	nano-, 10^{-9}
p	piko-, 10^{-12}
f	femto-, 10^{-15}

Zusammenfassung

Hintergrund:

Aufgrund ihrer begrenzten Therapiemöglichkeiten und vergleichsweise schlechten klinischen Prognose, ist gerade bei astrozytären Tumoren die Art und zeitliche Abfolge von genetischen Alterationen im Rahmen der Onkogenese von großem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expressionsanalyse für die tumorassoziierten Gene IL13R α 2, OLIG2 und DBCCR1 in diffusen und anaplastischen Astrozytomen, sowie Glioblastomen und deren Rezidiven durchgeführt.

IL13R α 2 kodiert für ein 65 kDa Protein, welches eine der möglichen Untereinheiten des Interleukin 13-Rezeptors darstellt und vor allem auf humanen Tumorzellen unterschiedlicher Dignität exprimiert wird. IL13R α 2 fungiert dabei unter anderem als Blindrezeptor für Interleukin 4, da IL-4 bei Interaktion mit dem IL-4 Rezeptor proliferationshemmend wirkt, fehlt dieser Einfluss entsprechend bei starker Expression von IL13R α 2. Zusätzlich wird IL13R α 2 aufgrund seiner hohen Affinität zu IL-13 als Zielstruktur für eine spezifische Chemotherapie aus einem Fusionsprotein aus IL-13 und einem Pseudomonas-Exotoxin verwendet.

Das Gen OLIG2 kodiert für einen basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktor, für den eine wichtige Funktion bei der Differenzierung von Motoneuronen, sowie Oligodendrozyten und Astrozyten aus neuroepithelialen Vorläuferzellen nachgewiesen wurde. OLIG2 verhindert die Komplexbildung zwischen dem Transkriptions-Coaktivator p300 und STAT3, was zu einer Reduktion der GFAP-Expression führt. Da GFAP ein wichtiger Promotor der Astrozytendifferenzierung ist, führt eine hohe OLIG2-Expression entsprechend zu einer verminderten Astrozytenproliferation.

DBCCR1 wird eine Funktion als Tumorsuppressorgen zugesprochen, da gerade in Harnblasentumoren eine Deletion oder funktionelle Inaktivierung dieses Gens beobachtet werden konnte. Dabei scheint DBCCR1 Einfluss auf den Zellzyklus zu nehmen, eine Expression führt z.B. bei Harnblasenkarzinomzellen zu einer Akkumulation von Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus und eine Verminderung von Zellen in der S und G₂/M-Phase.

Material und Methoden:

Die Expressionsanalyse wurde an insgesamt 51 nativen Tumorproben durchgeführt, dabei handelte es sich um 6 diffuse Astrozytome, 11 anaplastische Astrozytome, 23 primäre Glioblastome und 11 Rezidive eines Glioblastoms nach vorangegangener Resektion, sowie Radiatio mit 60 Gy und Chemotherapie mit Nimustine (ACNU) und Teniposid (VM26). Es wurde eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression mittels Real-Time PCR unter Zuhilfenahme des ABI™ PRISM 7700 und des Qiagen QuantiTect® SYBR Green PCR kits vorgenommen. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe des T-Tests für unabhängige Stichproben.

Ergebnisse:

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten ergab eine signifikant niedrigere IL13R α 2-Expression in Glioblastomrezidiven verglichen mit unbehandelten primären Glioblastomen. Insgesamt ergab der Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Tumoren (AA und GBM) ebenfalls einen statistisch signifikanten Expressionsunterschied.

Die OLIG2-Expression in anaplastischen Astrozytomen war in Relation zu allen anderen Tumorgraden signifikant erhöht, wobei sich zwischen den übrigen Graden keine signifikanten Unterschiede ergaben.

Die DBCCR1-Expression zeigte im Hinblick auf Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorgraden keine statistische Signifikanz.

Schlussfolgerung:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben keine Hinweise für eine Beteiligung von IL13R α 2 bei dem malignen Progress von diffusen Astrozytomen zu Glioblastomen. Die signifikant niedrigere IL13R α 2-Expression in Glioblastomrezidiven nach Radiochemotherapie deutet jedoch auf eine mögliche Rolle dieses Gens bei der Rezidivtumorbildung hin. IL13R α 2 könnte dabei zum einen als protektiver Faktor gegenüber der tumorspezifischen Therapie dienen, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die reduzierte IL13R α 2-Expression zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen führt.

Die signifikant erhöhte OLIG2-Expression in anaplastischen Astrozytomen im Vergleich mit allen anderen Tumorproben unterstreicht auf der einen Seite die

histomorphologische Heterogenität dieser Malignome, auf der anderen Seite könnte das Expressionslevel von OLIG2 eine Aussage über den zu erwartenden Therapieerfolg einer Chemotherapie ermöglichen. OLIG2 ist als Differenzierungsgen vor allem in Oligodendrozyten zu finden. Da Oligodendrogliome in der Regel ein besseres Ansprechen auf Chemotherapeutika aufweisen, ist es denkbar, dass auch als anaplastische Astrozytome eingestufte Tumore mit hohem OLIG2-Expressionslevel besser auf diese Therapie ansprechen.

Das Fehlen signifikanter Unterschiede zwischen der DBCCR1-Expression in den hier untersuchten Tumorproben legt die Schlussfolgerung nahe, dass dieses Gen anders als in Harnblasentumoren wohl keine Rolle bei der Onkogenese astrozytärer Tumoren spielt.

Summary

Objective:

Due to their limited therapy options and comparatively poor clinical prognosis the type and timing of appearance of genetic alterations in the course of oncogenesis of astocytic tumors is of great scientific interest. In this thesis an expression analysis of the tumor-associated genes IL13R α 2, OLIG2 and DBCCR1 was performed on diffuse and anaplastic astrocytomas as well as on glioblastomas and recurrent glioblastomas.

IL13R α 2 encodes for a 65 kDa protein which forms one of the possible subunits of the interleukin-13 receptor and is highly expressed on various kinds of human tumor cells. One of the functions of the IL13R α 2 chain is the one of a blind-receptor for interleukin-4. Since the interaction of IL-4 with its regular receptor has a negative effect on cell-proliferation, a high IL13R α 2 expression causes a reduction of this effect. In addition IL13R α 2 binds IL-13 with a very high affinity which makes it a target-structure for a specific chemotherapy with a fusion-protein consisting of IL-13 and a pseudomonas exotoxin.

The gene OLIG2 encodes for a basic helix-loop-helix transcription-factor which has an important function during the differentiation of motoneurons as well as oligodendrocytes and astrocytes from the neuronal progenitor cells. OLIG2 inhibits the complex formation between the transcription-coactivator p300 and STAT3. This leads to a reduced GFAP expression, since GFAP is an important promoter of astrocyte differentiation a high OLIG2 expression has a negative effect on astrocyte proliferation.

DBCCR1 has a proposed function as a tumorsuppressor gene. Especially in bladder cancer a deletion or functional inactivation of this gene has been observed. DBCCR1 seems to affect the cell cycle. Re-inducing the expression of this gene for example in bladder-cancer cells has lead to an accumulation of cells in the G₁-phase of the cell cycle and a reduction of cells in the S- and G₂/M-phase.

Material and Methods:

Research was conducted on a total of 51 native tumor-samples, 6 of them were diffuse astrocytomas, 11 were anaplastic astrocytomas, 23 were primary glioblastomas and 11 were recurrent glioblastomas after previous resection and treatment with radiation (60 Gy) and chemotherapy with Nimustine (ACNU) and Teniposid (VM26). A relative quantification of the mRNA expression was performed by real-time PCR analysis using the ABI™ PRISM 7700 and Qiagen QuantiTect® SYBR Green PCR kits. Statistical significance of differences in the expression levels between the different tumor grades was evaluated using the independent samples T-test.

Results:

Statistical evaluation of the collected data showed a significantly reduced IL13Rα2 expression in recurrent glioblastomas compared with untreated primary glioblastomas. The combined data of the untreated anaplastic astrocytomas and primary glioblastomas showed a significant difference in expression compared to the recurrent glioblastomas as well.

OLIG2 expression in anaplastic astrocytomas was significantly higher than in all other tumor-grades, but the comparison of the other groups showed no significant differences.

The results for the DBCCR1 expression in the different tumor-grades did not reveal any statistically relevant differences.

Conclusion:

The results of this thesis do not point towards an involvement of IL13Rα2 in the malignant progress from diffuse astrocytomas to glioblastomas. But the significantly reduced expression of IL13Rα2 in recurrent glioblastomas after combined radiation and chemotherapy imply a possible contribution of this gene to the formation of recurrent tumors. In this case IL13Rα2 could serve as a protective factor against tumor-specific therapy and / or lead to higher proliferation-rate of the malignant cells.

The significantly higher OLIG2 expression in anaplastic astrocytomas compared to all other tumor-grades supports the histomorphological heterogeneity of these malignomas. On the other hand the expression-level of OLIG2 could

possibly serve as a prognostic marker for the expectable clinical success of chemotherapy. As a gene involved into differentiation processes OLIG2 can be found especially in oligodendrocytes. Since oligodendroglioma in general show a better response to chemotherapy than other gliomas, it is possible that anaplastic astrocytes with a high OLIG2 expression show a better reaction to this kind of therapy as well.

The absence of statistically significant differences between the DBCCR1 expression in the examined tumor-samples points towards a missing function of this gene in the oncogenesis of astrocytic tumors in contrast to its role in bladder-cancer.

1. Einleitung und Grundlagen

1.1 Thematische Einführung und Fragestellung

Wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Todesursachenstatistiken der westlichen Industrieländer noch von Infektionskrankheiten angeführt, so hat sich im Laufe der Jahre, analog zu den veränderten Lebensbedingungen, dieses Bild entscheidend geändert. Heute stehen bösartige Neubildungen hinter den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems an zweiter Stelle der Todesursachen. Nach Angaben des *Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden (2008)* war im Jahre 2007 mehr als jeder vierte Todesfall (26,3%) in Deutschland auf ein Tumorleiden zurückzuführen. Vor diesem Hintergrund ist es umso verständlicher, dass die Erforschung von Auslösern, Mechanismen und Therapiemöglichkeiten dieses Formenkreises von Erkrankungen einen Fokus medizinischer und humanbiologischer Forschung bildet.

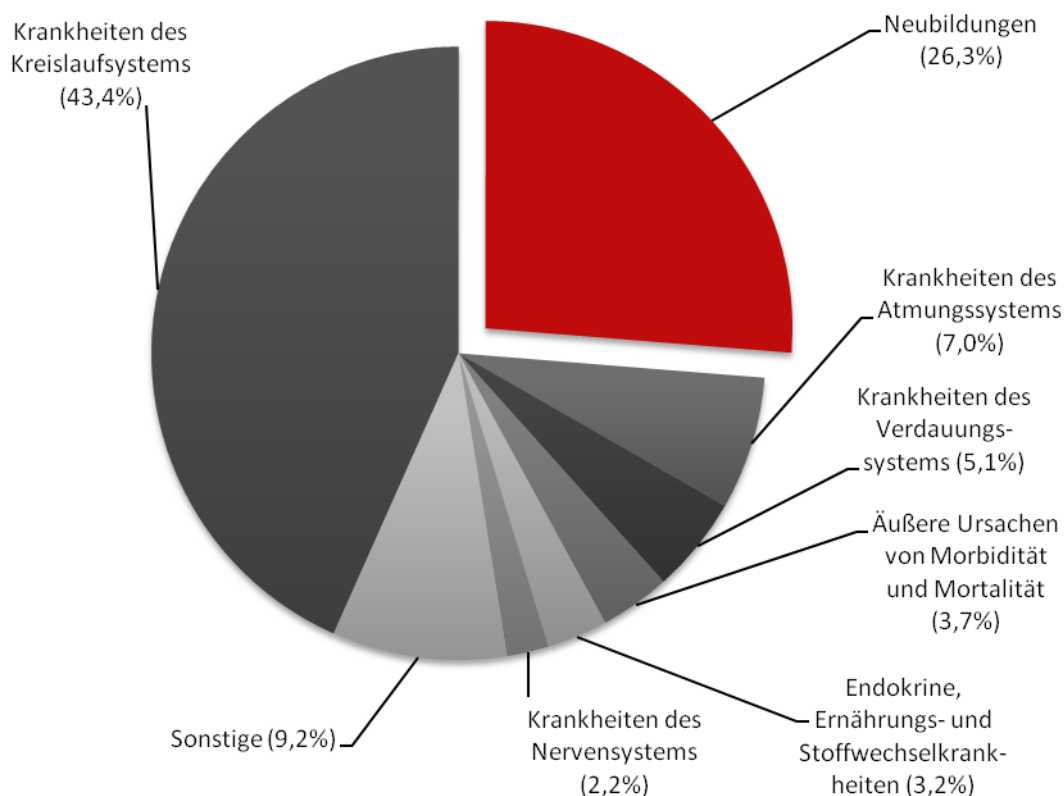


Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland im Jahre 2007 (Angaben in Prozent).
Datenquelle: *Statistisches Bundesamt in Wiesbaden, Fachserie 12 Reihe 4 (2008)*

Die zunehmende Verfeinerung molekularbiologischer Analysemethoden führte in den letzten Jahrzehnten zu einem stetig wachsenden Verständnis hinsichtlich der Relevanz einzelner Gene oder Gengruppen für die physiologische Funktion einer Zelle und damit auch für die Funktion von Organen und Organsystemen. Die zunehmende Entschlüsselung der regulatorischen Eigenschaften bestimmter Gene bezüglich Zellproliferation, Zellinteraktion und Zellfunktion führte darüber hinaus aber auch zu einem größer werdenden Wissen über die Bedeutung einer fehlenden oder falschen Funktion einzelner Gene für die Onkogenese humaner Tumoren.

Vor allem durch den Einsatz von Array-Untersuchungen wurde in kurzer Zeit eine hohe Zahl von Genen identifiziert, deren Expression in Tumorgewebe verglichen mit gesundem Gewebe oder Tumorgewebe anderer Malignitätsgrade gesteigert oder reduziert ist. Diese Beobachtung ist ein erster wichtiger Hinweis für eine mögliche Beteiligung eines Gens an der malignen Transformation einer Zelle. Dabei ist der Auslöser der Expressionsveränderung nicht zwangsläufig eine Mutation oder Deletion des entsprechenden Gens, viel häufiger sind epigenetische Mechanismen. Ziel weiterführender Studien muss in jedem Fall sein, zu eruieren ob eine Expressionsveränderung essentiell für die Tumorentwicklung ist, ob sie zur Ausbildung des Phänotyps des Tumors beiträgt ohne essentiell für dessen Entstehung zu sein oder ob die Veränderung zufällig und irrelevant ist (*Schulz, 2005*).

Im Allgemeinen besitzen diejenigen Gene bzw. Genprodukte, deren Rolle in der Entwicklung von Tumoren bekannt ist, eine physiologische Funktion bei der Zellproliferation oder Zelldifferenzierung. In einer gesunden Zelle wirken sie in einem Netzwerk synergistischer und antagonistischer Interaktion und halten damit die physiologische Funktion der Zelle aufrecht. Die Tumorentwicklung ist durch Fehlregulationen bzw. strukturelle Veränderungen in diesem Netzwerk gekennzeichnet. Die beiden wichtigsten antagonistischen Systeme für das Tumorstadiums werden von den (Proto-) Onkogenen und Tumorsuppressorgenen bzw. ihren Genprodukten repräsentiert. Darüber hinaus spielen bei der Tumorentwicklung noch eine Reihe von weiteren Gensystemen

eine Rolle. Hierzu zählen beispielsweise die Apoptosegene, sowie die DNA-Reparaturgene (*Böcker et al., 2001*).

Neben den hier genannten Genen und Gengruppen existiert jedoch noch eine Vielzahl weiterer Gene, für die eine Rolle bei der Entstehung von Neoplasien gefunden wurde bzw. vermutet wird. Der Forschungsstand bezüglich der einzelnen Gene ist unterschiedlich gut und ebenso variiert das Wissen über die Zuordnung der jeweiligen Gene zu den unterschiedlichen Tumorentitäten (*Böcker et al., 2001*).

Die vorliegende Arbeit basiert auf den Ergebnissen vorangegangener Microarray-Untersuchungen an anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen (*Bozinov et al., 2007*). Hierbei waren zwischen den beiden Tumorentitäten signifikante Expressionsunterschiede für die drei tumorassoziierten Gene IL13R α 2, OLIG2 und DBCCR1 gefunden worden. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, die Expression der drei genannten Gene mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR anhand einer größeren Anzahl von Proben genauer zu erforschen. Neben anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen wurden dabei zusätzlich diffuse Astrozytome und Glioblastomrezidive untersucht. Die gemessene relative Expression der drei Zielgene soll daraufhin untersucht werden, ob sich Anhaltspunkte für eine Funktion von IL13R α 2, OLIG2 und DBCCR1 bei der Entstehung und dem malignen Progress von diffus infiltrierenden Astrozytomen, sowie für die Rezidivierungstendenz von Glioblastomen ergeben.

Obwohl maligne Astrozytome nur 2% aller Tumorerkrankungen des Erwachsenenalters mit ca. 5 – 6 Neuerkrankungen pro 100.000 Erwachsenen pro Jahr ausmachen, stellen sie durch ihre spezifischen Eigenschaften die viert häufigste Ursache für Todesfälle in Verbindung mit neoplastischen Erkrankungen dar. Aufgrund der limitierten Therapiemöglichkeiten und der vergleichsweise schlechten Prognose astrozytärer Tumoren besitzt die Entschlüsselung der genetischen Mechanismen, die der Tumorentstehung und der Malignisierung dieser Tumoren zugrunde liegen, einen großen Stellenwert. Es besteht die Hoffnung, dass sich hierüber nicht nur bessere prognostische Aussagen treffen lassen, sondern dass auch eine Verbesserung der

Behandlung von Astrozytompatienten zu erzielen ist. Dabei könnte die Individualisierung der Therapie auf die spezifischen genetischen Eigenschaften des jeweiligen Malignoms eine entscheidende Rolle spielen. Tatsächlich haben neuere Studien gezeigt, dass die Klassifikation maligner Gliome nach Genexpressionsprofilen teilweise besser mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korreliert, als die Klassifikation nach histologischen Kriterien (*Nutt et al., 2003; Freije et al., 2004*).

1.2 Astrozytome

Der Begriff „Astrozytom“ wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts von Rudolf Virchow verwendet und als feststehender Ausdruck 1926 von *Bailey und Cushing (1926)* in die Histopathologie eingeführt.

Hinter dem Begriff „Astrozytom“ verbirgt sich eine heterogene Gruppe an Tumoren astrozytären Ursprungs, die sich stark bezüglich der Lokalisation ihres Auftretens im Zentralnervensystem, der Alters- und Geschlechtsverteilung, der histopathologischen und biologischen Eigenschaften, dem Wachstumspotential und der Tendenz zur Malignisierung, sowie dem klinischen Verlauf unterscheiden.

Das heute am häufigsten genutzte Schema zur Unterteilung dieser heterogenen Gruppe ist die „WHO-Klassifikation der Tumore des Nervensystems“. Hiernach werden der Gruppe der astrozytären Tumore insgesamt 12 Unterformen zugeordnet. Sie werden nach ihrem biologischen Verhalten und damit nach ihrer Malignität in die Schweregrade I bis IV eingeteilt. Dieses Klassifikations-Schema wurde zum ersten Mal 1979 von einer Consensus-Konferenz in Genf vorgeschlagen und im selben Jahr von *Zülch* publiziert. Seither unterliegt es einer stetigen Weiterentwicklung unter Einbeziehung neuester Forschungsergebnisse. Die vierte und aktuellste Version stammt aus dem Jahre 2007 (*Louis et al., 2007*).

Pilozytisches Astrozytom Pilomyxoides Astrozytom	WHO-Grad I
Subependymales großzelliges Riesenzellastrozytom	WHO-Grad I
Pleomorphes Xanthoastrozytom	WHO-Grad II
Diffuses Astrozytom Fibrilläres Astrozytom Protoplasmatisches Astrozytom Gemistozytäres Astrozytom	WHO-Grad II
Anaplastisches Astrozytom	WHO-Grad III
Glioblastom Großzelliges Glioblastom Gliosarkom	WHO-Grad IV
Gliomatosis cerebri	WHO-Grad IV

Tabelle 1: WHO-Klassifizierung astrozytärer Tumoren (nach: *Louis, Ohgaki, Wiestler, Cavenee, 2007*)

Zur besseren Übersicht lassen sich die verschiedenen Unterformen der Astrozytome in zwei Kategorien unterteilen. Biologische und genetische Daten deuten auf eine Verwandtschaft der diffusen und anaplastischen Astrozytome, sowie der Glioblastome hin. Sie werden auch unter dem Begriff „diffus infiltrierende Astrozytome“ zusammengefasst und stellen die häufigsten Formen astrozytärer Tumoren dar (*Kleihues et al., 2000; Louis et al., 2007*). Ihnen gilt das Augenmerk der vorliegenden Arbeit.

Bei den übrigen Astrozytomen handelt es sich wahrscheinlich um eigenständige Entitäten, welche in keinem wesentlichen Zusammenhang zueinander stehen. Insgesamt handelt es sich bei den pleomorphen Xanthoastrozytomen und den subependymalen großzelligen Riesenzellastrozytomen um sehr seltene Tumoren. Sie treten in der Regel bei Kindern und jungen Erwachsenen auf und zeichnen sich durch ein langsames und umschriebenes Wachstum aus. Sie haben nur eine schwache Tendenz zur Malignisierung und können durch eine vollständige Resektion geheilt werden (*Kleihues et al., 2000*).

1.2.1 Diffus infiltrierende Astrozytome

Die den diffus infiltrierenden Astrozytomen zugeordneten neuroepithelialen Tumore teilen eine Reihe von wichtigen Eigenschaften. Sie treten in allen Teilen des zentralen Nervensystems, jedoch bevorzugt in den Großhirnhemisphären, auf. In der überwiegenden Zahl der Fälle manifestieren sie sich im Erwachsenenalter. Ihre histopathologischen und biologischen Eigenschaften variieren stark. Sie zeigen eine diffuse Infiltration in angrenzende und entfernte Hirnstrukturen mit geringer Äquivalenz zu ihrem histologischen Grad. Außerdem neigen sie zu einer Malignisierung mit dem Glioblastom als bösartigsten phänotypischen Endpunkt (*Kleihues et al., 2000*).

Mit einem Anteil von 60% an allen primären Hirntumoren sind diffus infiltrierende Astrozytome die häufigsten intrakraniellen Neoplasien. Ihre Inzidenz ist regionsabhängig, liegt in der Regel aber zwischen 5 – 7 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (*Kleihues et al., 2000*).

Die Zuordnung eines Tumors zu einem bestimmten WHO-Grad ist schwierig und mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, da diffus infiltrierende Astrozytome in ihrer Tumormasse häufig heterogen sind und sich in niedrig-gradigen Astrozytomen vereinzelte Foki höherer Malignität finden. Trotzdem ist die Einordnung eines Tumors wichtig, da sich mit Rücksicht auf den WHO-Grad des Astrozytoms Aussagen über das biologische Verhalten und somit über die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnosestellung machen lassen. Diese liegt für diffuse Astrozytome (WHO-Grad II) bei über 5 Jahren, für anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III) bei 2 – 5 Jahren und für Glioblastome (WHO-Grad IV) bei knapp einem Jahr. Dabei spielen aber noch eine Vielzahl an klinischen Einflussgrößen, wie z.B. das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten, sowie die Art der medizinischen Behandlung des Astrozytomes eine wichtige Rolle (*Kleihues et al., 2000*).

Die Ätiologie der diffus infiltrierenden Astrozytome ist weitestgehend unbekannt. Ein vermehrtes Auftreten in Verbindung mit erblichen Tumorsyndromen, wie z.B. dem Li-Fraumeni-Syndrom, wird beobachtet (*Kleihues et al., 2000*). Der Versuch einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Erkrankung an einem diffus infiltrierendem Astrozytom und der Exposition mit einem spezifischen Umwelteinfluß herzustellen, war bis jetzt wenig erfolgreich. Als einziger

bestätigter Risikofaktor gilt die Bestrahlungstherapie im Rahmen anderer neoplastischer Erkrankungen. Eindrücklich gezeigt wurde dieser Zusammenhang für die prophylaktische Bestrahlung des Zentralnervensystems bei Kindern, die an einer akuten lymphatischen Leukämie erkrankt waren. Hier konnte ein signifikant vermehrtes Vorkommen von diffus infiltrierenden Astrozytomen nachgewiesen werden (*Edwards et al., 1986; Neglia et al., 1991*). Wie bei Tumoren anderer Organe ist die Progression der Astrozytome begleitet von einer Akkumulation genetischer Veränderungen. Beim diffusen Astrozytom findet sich häufig eine Inaktivierung des p53-Tumorsuppressorgens. Beim anaplastischen Astrozytom findet sich zusätzlich ein Verlust von genetischen Material auf Chromosom 19q, bei Glioblastomen häufig eine Deletion großer Abschnitte des Chromosoms 10 (*Reifenberger et al., 2004*).

1.2.2 Diffuse Astrozytome (WHO-Grad II)

Die diffusen Astrozytome zeichnen sich durch einen hohen Grad an zellulärer Differenzierung, langsames Wachstum und eine diffuse Infiltration benachbarter Gehirnstrukturen aus. Typischerweise sind vornehmlich junge Erwachsene betroffen. Diffuse Astrozytome haben ein geringes Wachstumspotential, entsprechen demzufolge dem WHO-Grad II. Sie besitzen aber eine intrinsische Tendenz für eine Malignisierung zu einem anaplastischen Astrozytom und darüber hinaus zu einem sekundären Glioblastom (*Kleihues et al., 2000*).

Etwa 10 – 15% aller astrozytären Hirntumore sind diffuse Astrozytome. Die Inzidenz beträgt 1,4 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner pro Jahr, wobei ein Altersgipfel zwischen 30 und 40 Jahren zu verzeichnen ist. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 34 Jahren. Männer erkranken geringfügig häufiger als Frauen (1,18 : 1) (*Kleihues et al., 2000*).

Diffuse Astrozytome können in allen Bereichen des zentralen Nervensystems auftreten. Üblicherweise entwickeln sie sich aber supratentoriell in den Frontal- und Temporallappen. Das Cerebellum ist nur äußerst selten betroffen. Aufgrund ihres infiltrativen Wachstums führen diffuse Astrozytome makroskopisch zu

einem Verstreichen anatomischer Grenzen. Es zeigt sich eine Vergrößerung und Verlagerung, aber keine Zerstörung der betroffenen Strukturen. Der Tumor kann sich sowohl als graue, als auch als gelb-weiße Masse mit unscharfen Grenzen darstellen. Außerdem können Zysten mit wasserheller Flüssigkeit und Granulationbereiche, sowie Konsistenzänderungen des Hirngewebes beobachtet werden. Die Tumoren können contralaterale Strukturen über das Corpus callosum infiltrieren (Tonn et al., 2006).

Histologisch stellen sich die diffusen Astrozytome als gut differenzierte astrozytäre Tumoren dar. Sie zeigen eine geringe Zelldichte und wenig mitotische Aktivität. Nekrosen und mikrovaskuläre Proliferation fehlen. Aufgrund ihrer Beschaffenheit werden drei Subtypen unterschieden. Das fibrilläre Astrozytom ist der häufigste Vertreter und zeigt mikroskopisch eine geringe Zelldichte. Es besteht aus isomorphen neoplastischen Astrozyten mit kleinen, runden Zellen in einer kleinzystisch aufgelockerten, faserreichen Matrix.

Das weniger häufige gemistozytische Astrozytom ist gekennzeichnet durch Tumorzellen mit großem, homogenem, eosinophilen Zytoplasma und exzentrischen Zellkernen. Für eine eindeutige Diagnose eines gemistozytischen Astrozytoms sollten mindestens 20% der Tumorzellen dieser Charakterisierung entsprechen.

Die dritte Variante ist das protoplasmatische Astrozytom. Es ist selten und zeigt in der histologischen Untersuchung Zellen mit eosinophilen Zytoplasma, eingebettet in mikrozystische oder mukoide Matrix.

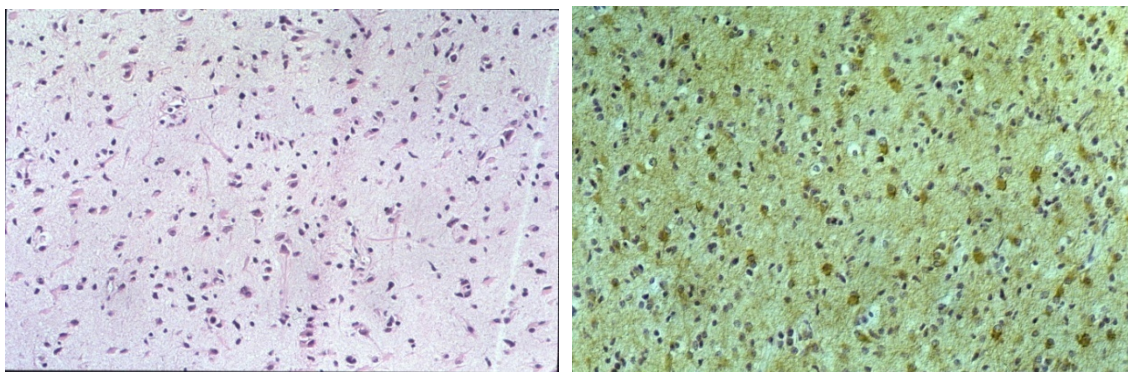


Abbildung 2: Histologische Bilder eines fibrillären Astrozytoms. Links HE-Färbung (x20), rechts GFAP-Färbung (x20). (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. U. Sure, Universitätsklinikum Essen)

Immunohistochemisch lässt sich in diffusen Astrozytomen das glial fibrillary acidic protein (GFAP) und das S-100 Protein nachweisen. Dabei färben sich gemistozytische und fibrilläre Astrozytome stark positiv für GFAP, protoplasmatische Astrozytome nur schwach. Der Ki-67 (MIB1) Labeling-Index ist niedrig (< 5%) (*Kleihues et al., 2000*).

Die am häufigsten beobachtete karyotypische Veränderung in diffusen Astrozytomen ist eine Trisomie bzw. Polysomie 7. In 50% der Fälle lässt sich das zusätzliche Vorliegen des Chromosoms 7 oder des 7q-Abschnittes nachweisen (*Reifenberger et al., 2004; Ichimura et al., 2004*). Eine weitere regelmäßige genetische Alteration ist die Mutation des TP53-Gens am Genlokus 17p13. 50 – 60% aller diffusen Astrozytome und bis zu 80% der gemistozytischen Tumore zeigen eine funktionelle Inaktivierung dieses Tumorsuppressorgens, was dafür spricht, dass diese Mutation ein früher Schritt zur Entwicklung eines malignen Glioms darstellt (*Watanabe et al., 1997*). In den übrigen Tumoren wird eine Vielzahl genetischer Veränderungen beobachtet, wobei die Amplifikation des EGFR (epidermal growth factor receptor) die nächst häufige ist (*Kleihues et al., 2000*).

1.2.3 Anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III)

Anaplastische Astrozytome entsprechen dem WHO-Grad III. Es handelt sich um diffus infiltrierende Astrozytome mit fokalen oder disseminierten Anaplasien und einem gesteigerten Proliferationspotential. Sie entwickeln sich auf dem Boden eines diffusen Astrozytom Grad II oder entstehen de novo, ohne Anzeichen für einen vorbestehenden Tumor niedrigeren Grades. Ein maligner Progress zu einem sekundären Glioblastom ist sehr häufig.

Sie entsprechen circa 10 – 25% aller astrozytären Tumoren. Das mittlere Erkrankungsalter ist mit 41 Jahren höher als bei den diffusen Astrozytomen, wobei der Altersgipfel bei 40 – 45 Jahren liegt. Männer erkranken fast doppelt so häufig, wie Frauen (1,8 : 1).

Anaplastische Astrozytome finden sich bevorzugt in den Großhirnhemisphären, wobei bei Kindern und jungen Erwachsenen der Hirnstamm und Thalamus ebenfalls häufig betroffen sind. Makroskopisch stellen sie sich als unscharf begrenzte, verdrängende Läsionen mit perifokalem Ödem dar.

Histologisch sind anaplastische Astrozytome durch Zeichen fokaler oder diffuser Anaplasie gekennzeichnet. Es finden sich eine erhöhte Proliferation, Kernatypien und eine verstärkte mitotische Aktivität. Mikrovaskuläre Proliferation und Nekrosen fehlen. Immunohistochemisch färben sie sich positiv für GFAP und das S-100 Protein. Bei etwa 60% der Tumoren lässt sich nukleär p53 nachweisen. Der Ki-67 (MIB1) Labeling-Index liegt bei über 5% (*Kleihues et al., 2000*).

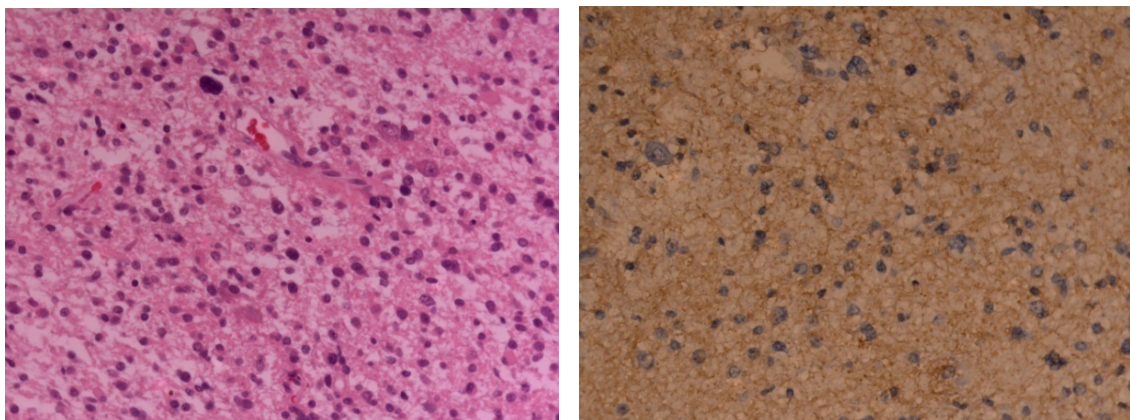


Abbildung 3: Histologische Bilder eines anaplastischen Astrozytoms. Links HE-Färbung (x40), rechts GFAP-Färbung (x40). (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Pagenstecher, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Marburg)

Neben den bereits für diffuse Astrozytome beschriebenen genetischen Alterationen, findet sich in ca. 20 – 25% der anaplastischen Astrozytome eine Deletion oder Hypermethylierung des CDKN2A- oder des CDKN2B-Tumorsuppressorgens am Genlokus 9p21. Tumor, die diese Veränderung nicht besitzen, zeigen häufig eine Amplifikation des CDK4-Gens oder Mutationen des Retinoblastomgens (RB1) (*Reifenberger et al., 2004; Ichimura et al., 2004*).

1.2.4 Glioblastom (WHO-Grad IV)

Das Glioblastom stellt die bösartigste Form der astrozytären Tumoren dar und entspricht demzufolge einem Astrozytom des WHO-Grades IV. Gleichzeitig sind Glioblastome auch die am häufigsten diagnostizierten Hirntumore. Sie machen einen Anteil von 12 – 15% aller intracranieller Neoplasien aus und bilden auch innerhalb der Astrozytome mit 50 – 60% die größte Gruppe. Die Inzidenz liegt bei 2 – 3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Glioblastome können sich in jeder Altersgruppe entwickeln, treten aber am häufigsten bei Patienten im Alter von 50 - 70 Jahren auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 53 Jahren, wobei aber beachtet werden muss, dass ca. 8,8% aller Glioblastome bei Kindern auftreten. Männer sind signifikant häufiger betroffen als Frauen (1,5 : 1) (*Kleihues et al., 2000*).

Klinisch lassen sich zwei Formen von Glioblastomen unterscheiden. Die primären Glioblastome sind am häufigsten und entwickeln sich de novo, ohne Anzeichen für eine Vorgängerkäsion. Typisch sind eine kurze klinische Vorgeschichte und ein schneller Progress.

Sekundäre Glioblastome hingegen entstehen auf dem Boden eines vorbestehenden niedriger-gradigen Tumors und haben demzufolge eine längere Krankengeschichte.

Morphologisch lassen sich diese beiden Formen nicht unterscheiden, klinisch entwickeln sich sekundäre Glioblastome aber häufiger bei jungen Patienten, wohingegen primäre Glioblastome vermehrt bei Patienten über 45 Jahren auftreten. Die klinische Prognose ist jedoch bei beiden Arten gleich schlecht (*Ohgaki et al., 2004*).

Die große Mehrheit der Glioblastome entwickelt sich in den Großhirnhemisphären. Obwohl infiltratives Wachstum ein Kennzeichen aller hier beschriebenen Astrozytome ist, stechen Glioblastome durch ihre rapide Infiltration in angrenzende Gehirnstrukturen hervor. Häufig zu beobachten ist die Ausdehnung des Tumors über das Corpus callosum in die contralaterale Hemisphäre. Dies führt zu dem Bild einer bilateralen symmetrischen Läsion, auch Schmetterlings-Gliom genannt. Außerdem breiten sich Glioblastome

ebenfalls schnell in die Capsula interna, die Fornix und die vordere Commissur aus. Ein Befall des Hirnstammes tritt fast ausschließlich bei Kindern auf. Glioblastome des Cerebellums und des Rückenmarks sind sehr selten. Die betroffenen Strukturen werden vergrößert und verdrängt. Gleichzeitig dienen sie als Ausbreitungsstraße, über die der Tumor in entfernte Hirnareale metastasieren kann, was zu dem Bild eines multifokalen Astrozytoms führt. Trotzdem kommt es aber nur selten zu einer Infiltration des Subarachnoidalraumes und demzufolge auch selten zur Bildung von Abtropfmetastasen über den Liquor cerebrospinalis. Auch eine hämatogene Streuung des Glioblastoms mit Metastasenwachstum in entfernteren Körperregionen wird ohne chirurgische Intervention nur selten beobachtet (*Kleihues et al., 2000; Hölper et al., 2006*).

Makroskopisch bieten Glioblastome ein buntes Bild mit einer grauen peripheren Zone, die eine zentrale gelblich, von nekrotischen Myelin gebildete Tumormasse umgibt. Oft finden sich vereinzelte rötlich-braune Punkte, die durch frische Einblutungen verursacht werden. Die zentrale nekrotische Tumormasse kann bis zu 80% des gesamten Tumors ausmachen. Neben kleinen Hämorrhagien, kann es auch zu größeren Einblutungen kommen, die dann als apoplex-artige Symptome imponieren und gegebenenfalls die ersten klinischen Anzeichen für das Tumorleiden darstellen (*Kleihues et al., 2000; Hölper et al., 2006*).

Histologisch bieten Glioblastome das Bild eines stark anaplastischen Tumors, der sich aus einer Vielzahl an Zellen unterschiedlicher Morphologie zusammensetzen kann. Es finden sich fibrilläre und gemistozytische Zellen, fusiforme Zellen, kleine anaplastische Zellen, sowie große mehrkernige Zellen. Kernatypien sind häufig ebenso wie eine hohe mitotische Aktivität. Hauptdiagnosekriterium sind das Vorkommen von Nekrosen und die mikrovaskuläre Proliferation, wobei letzteres sich in der Regel als glomerulum-artige oder girlanden-förmige kapilläre Struktur darstellt. Vaskuläre Thrombosen sind nicht selten. Neben der häufig zu findenden, makroskopisch sichtbaren zentralen Nekrose, lassen sich mikroskopisch zusätzlich multiple kleine,

irregulär geformte, band-artige Nekrosen beobachten, die von Pseudopalisadenzellen umgeben sind (Kleihues et al., 2000).

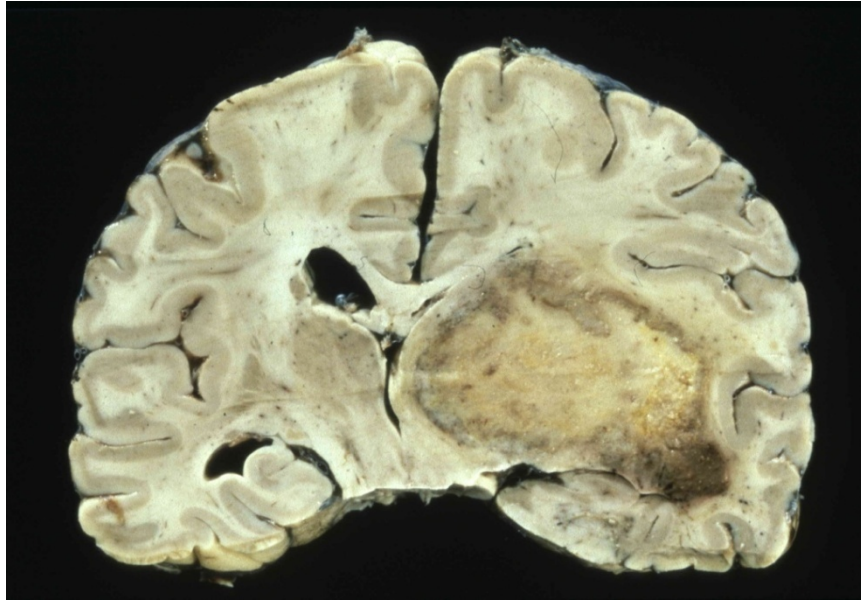


Abbildung 4: Makroskopisches Bild eines Glioblastoms. Deutlich zu erkennen sind die graue Mantelzone, die gelbliche zentrale Nekrose, sowie rötlich-braune Einblutungen. (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Sure, Universitätsklinikum Essen)

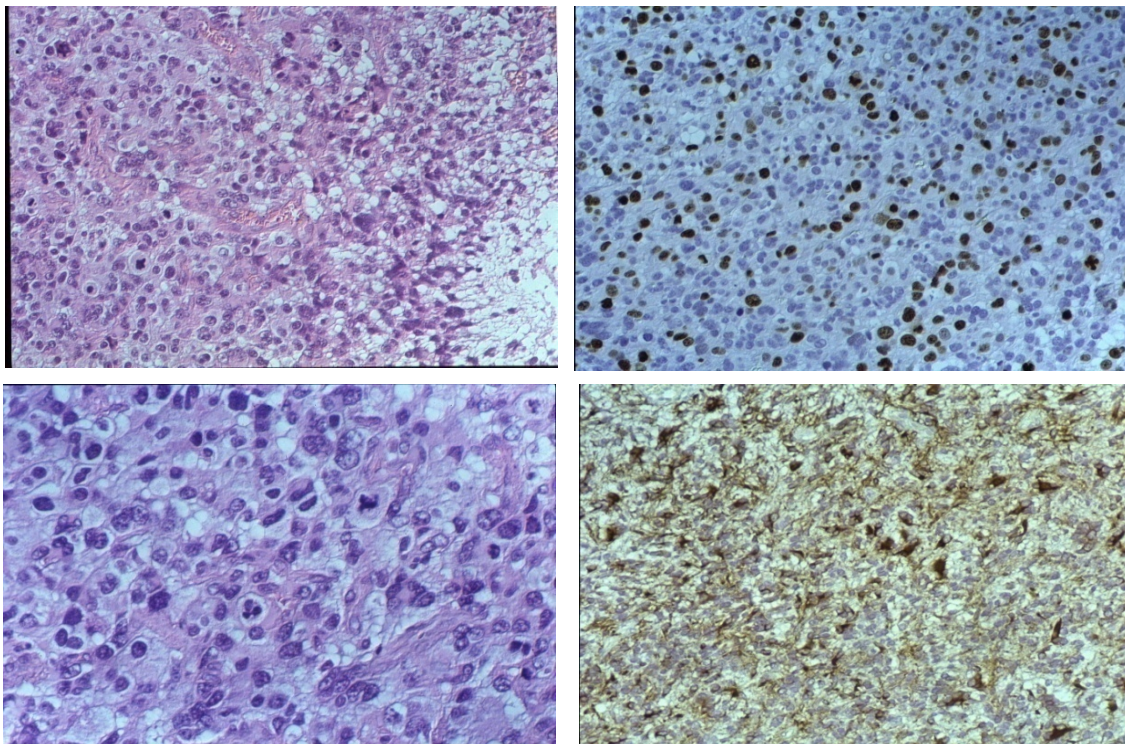


Abbildung 5: Histologische Bilder eines kindlichen Glioblastoms. Oben links HE-Färbung (x10), oben rechts MIB1-Labeling (x20), unten links HE-Färbung (x40), unten rechts GFAP-Färbung (x20). (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Sure, Universitätsklinikum Essen)

Immunohistochemisch lassen sich, wie bei den übrigen Astrozytomen auch, GFAP und S-100 Protein nachweisen. Dabei finden sich aber häufig inhomogene Verteilungen, da sich fibrilläre und gemistozytische Zellen positiv färben, kleine anaplastische Zellen aber nicht. In 30 – 40% aller Glioblastome kann eine starke Immunoreaktivität für p53 nachgewiesen werden. In etwa 60% der primären Glioblastome kann eine starke Expression des epidermal growth factor receptor (EGFR) nachgewiesen werden. Dieser ist aber bei sekundären Glioblastomen seltener. Der MIB1 Labeling-Index ist in der Regel hoch (> 10%), zeigt aber eine regionale Heterogenität (*Tonn et al., 2006*).

Hinsichtlich genetischer Alterationen beschrieben *Ohgaki et al. (2004)* deutliche Unterschiede zwischen primären und sekundären Glioblastomen. Primäre Glioblastome zeigen häufiger eine Amplifikation von EGFR, CDK4 und MDM2 oder MDM4. Zusätzlich findet sich vermehrt eine homozygote Deletion von CDKN2A, sowie eine Mutation von RB1 und PTEN. Eine Mutation des TP53-Gens wird in ca. 30% der primären, aber in 60% der sekundären Glioblastome gefunden. Desweiteren finden sich in sekundären Glioblastomen häufiger Verluste von 19q und 13q, sowie eine Hypermethylierung der Promotorregion des RB1-Gens und eine Überexpression von PDGFRA. Trotz dieser Unterschiede hinsichtlich der Art der genetischen Alterationen zwischen primären und sekundären Glioblastomen sind jedoch dieselben onkogenetischen Pathways betroffen (*Reifenberger et al., 2004*).

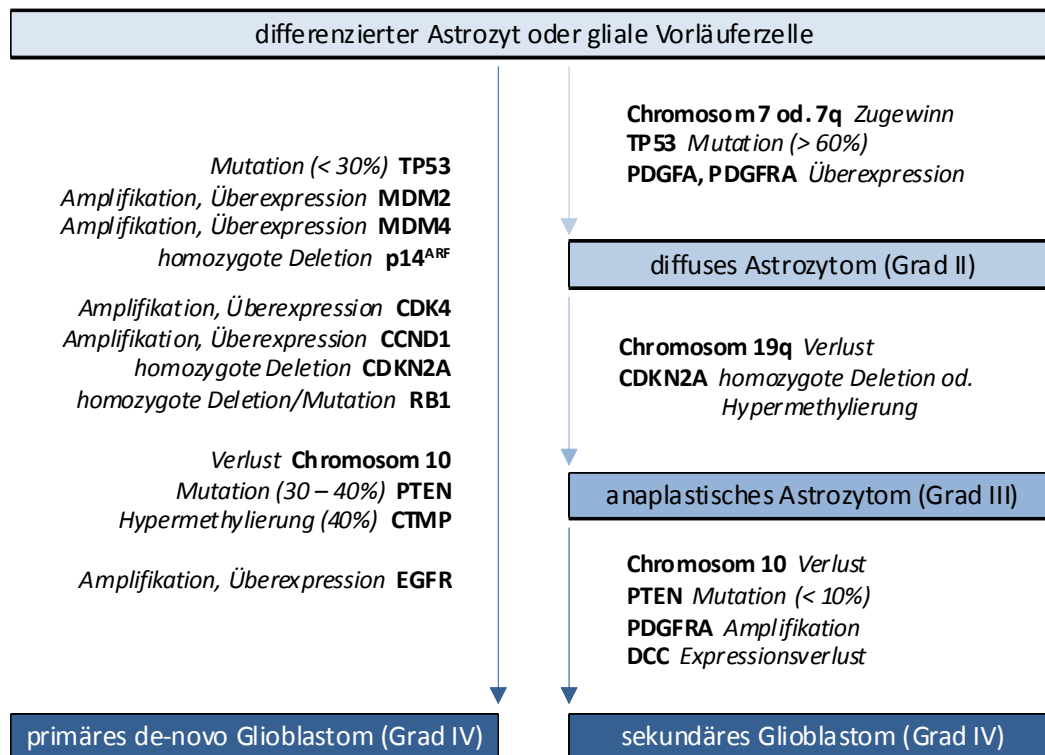


Abbildung 6: Zusammenstellung häufiger genetischer Alterationen während dem Progress von Astrozyten bzw. deren Vorläuferzellen zu primären oder sekundären Glioblastomen (nach Reifenberger et al., 2004)

1.2.5 Symptome

Für viele Formen humaner Malignome, wie z.B. dem Mamma- oder dem Colon-Carcinom, ist die Früherkennung der Erkrankung mittlerweile zu einem entscheidenden Aspekt des Diagnose- und Behandlungskonzeptes geworden. Die niedrige Inzidenz von Gliomen, sowie das Fehlen von spezifischen und einfach zu erhebenden Parametern führen aber dazu, dass Vorsorgeuntersuchungen hier keine Rolle spielen. Einzig bei Patienten mit hereditären Syndromen mit der Neigung zur Entwicklung von Gliomen, wie dem Li-Fraumeni-Syndrom oder dem Turcot-Syndrom werden bildgebende Verfahren als Screening-Methode eingesetzt. Die Einleitung von diagnostischen Maßnahmen beruht somit in der Regel auf dem Auftreten von abklärungsbedürftigen Symptomen (Weller et al., 2004).

Die klinischen Verdachtssymptome für eine intracranielle Raumforderung sind im Wesentlichen abhängig von der Lokalisation des Tumors. Zu den häufigsten Symptomen zählen neu aufgetretene fokale oder generalisierte zerebralorganische Krampfanfälle, vor allem bei Astrozytomen des Großhirns. Außerdem können fokalneurologische Defizite hinweisend sein, dabei treten in absteigender Häufigkeit motorische, visuelle und sprachliche Defizite auf. Unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen und Übelkeit können Zeichen eines erhöhten Hirndrucks sein, der durch den raumfordernden Effekt des Tumors und eine konsekutive Liquorzirkulationsstörung hervorgerufen wird. Nicht selten werden auch Persönlichkeitsveränderungen beobachtet. Akut auftretende Symptome, wie z.B. eine plötzliche Hemiparese, sind häufig auf Tumoreinblutungen zurückzuführen (*Tonn et al., 2006; Hölper et al., 2006*).

1.2.6 Diagnose

Bei klinischem Verdacht auf einen Hirntumor sind die Ergebnisse bildgebender Diagnostik richtungsweisend. Die MRT ohne und mit Kontrastmittel ist bei Beachtung ihrer Kontraindikationen die Methode der Wahl. Alternative kann aber auch eine CT-Untersuchung durchgeführt werden. Über die diagnostischen Informationen hinaus, liefert die radiologische Untersuchung auch wichtige Aussagen bezüglich der exakten Tumorlokalisierung und dessen Ausmaße, sowie zu anatomischen Lagebeziehungen. Diese Informationen sind für eine spätere operative Versorgung oder stereotaktische Biopsienahme essentiell. Die neurologische Untersuchung dient vor allem der Dokumentation der durch den Tumor bereits verursachten Defizite und ermöglicht so die Beurteilung späterer Folgen von Tumorwachstum und Therapie (*Diener et al., 2008*).

Der operative Eingriff ist bei Gliomen meist zugleich diagnostische und therapeutische Maßnahme. Eine mikroskopische morphologische Diagnostik ist für die Erstellung eines spezifischen neuroonkologischen Therapiekonzeptes essentiell. Bei Patienten in reduziertem Allgemeinzustand, bei schlecht zugänglichen Neoplasien und bei multiplen Läsionen kann die histologische

Sicherung der Diagnose auch mittels stereotaktischer Biopsie erfolgen (Hall, 1998). Abwartendes oder palliatives Vorgehen ohne Sicherung der Diagnose ist lediglich indiziert, wenn das Interventionsrisiko gegenüber dem Gewinn durch eine histologische oder zytologische Diagnose als gravierender eingeschätzt wird, als das Informationsdefizit durch mangelnde morphologische Sicherung der Diagnose (Weller, 2004).

Abgesehen von der Erstellung eines spezifischen neuroonkologischen Therapiekonzeptes können auf dem Boden der histopathologischen Diagnose zusätzlich wichtige prognostische Aussagen getroffen werden (Davis et al., 1999).

Tumor	Häufigkeit (% der hirneigenen Tumoren)	Inzidenz pro 100000/Jahr	Mittleres Alter bei Diagnose (Jahre)	2-Jahres- Überleben (%)	5-Jahres- Überleben (%)
Diffuses Astrozytom	1,3	0,17	47	67	49
Anaplastisches Astrozytom	4,3	0,54	50	46	31
Glioblastom	22,6	2,94	62	9	3

Tabelle 2: Überlebensraten 2 und 5 Jahre nach Diagnose eines primären Hirntumors. (Modifiziert nach: Davis et al., 1999)

1.2.7 Therapie

Die operative Intervention ist unter Berücksichtigung eventueller Kontraindikationen die wichtigste Maßnahme in der Therapie von Gliomen und speziell von astrozytären Tumoren. Das Ziel der Tumorsektion ist die größtmögliche Reduktion von Tumormasse, die Entlastung des Hirndrucks und die Wiederherstellung einer ungestörten neurologischen Funktion. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Prävention neuer neurologischer Defizite eine höhere Priorität besitzt, als die Radikalität der Operation. Im Interesse der Funktionserhaltung sind mikrochirurgische Operationstechniken erforderlich. Bei Operationen in funktionell wichtigen Arealen ist ein Monitoring der jeweiligen Hirnfunktionen nützlich. Zur weiteren intraoperativen Unterstützung werden vermehrt Verfahren, wie die Neuronavigation,

Ultraschalldiagnostik, MRT und fluoreszenzgestützte Verfahren eingesetzt. Dennoch ist aufgrund des infiltrativen Wachstums als biologische Eigenschaft astrozytärer Tumoren eine komplette Resektion aller Tumorzellen in der Regel nicht zu erreichen, da die Tumordinfiltration im Allgemeinen deutlich über die Grenze des makroskopisch erkennbaren Tumors hinausreicht (*Diener et al., 2008*).

Innerhalb von 72 Stunden nach dem operativen Eingriff sollte zur Bestimmung und Dokumentation des Ergebnisses der Resektion sowie zum Nachweis möglicher Frühkomplikationen eine MRT- oder CT-Untersuchung ohne und mit Kontrastmittel durchgeführt werden. Aufgrund der höheren Aussagekraft ist dabei der MRT der Vorzug zu geben (*Albert et al., 1994*).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine postoperative Strahlentherapie, insbesondere bei geringer Resttumormasse die Überlebenszeit der Patienten bei guter Lebensqualität verlängert. Dabei ist die Indikation für eine Strahlentherapie vor dem Hintergrund des histologischen Grades des Tumors und dem Ausmaß seiner Resektion, sowie weiterer Prognoseparametern, wie Alter, Karnofsky-Index und verbliebenen Symptomen, zu stellen (*Curran et al., 1993*). Die Ganzhirnbestrahlung führt bei Gliomen zu keiner Verbesserung des Ergebnisses gegenüber einer lokalen Strahlentherapie. Diese sollte anhand prä- und postoperativer Schnittbilddiagnostik geplant werden, wobei die Signalabnormität in T2-gewichteten MRT-Bildern das minimale Zielvolumen definiert (*Laperriere et al., 2002*).

Als weitere postoperative Therapieoption steht ergänzend zur Strahlentherapie die Chemotherapie zur Verfügung. Voraussetzung für ihre Durchführung ist ein hämatologisch unauffälliger Patient mit einer uneingeschränkten Leber- und Nierenfunktion, sowie das Fehlen von kardiologischen und pneumologischen Erkrankungen. Während der Behandlung sind regelmäßige Blutbildkontrollen erforderlich.

Eine Reihe chemotherapeutische Substanzen werden in der Behandlung von Gliomen eingesetzt. Weithin etabliert sind die Nitrosoharnstoffe Nimustin (ACNU), Carmustin (BCNU), Lomustin (CCNU) und Procarbazine (PCB), welche

als lipophile Alkylanzien die DNA- und Proteinsynthese hemmen und ausschließlich bei proliferierenden Zellen zur Apoptose führen. Obwohl die genannten Substanzen auch als Monotherapeutika Anwendung finden, werden sie häufig in Kombinationschemata angewendet.

Eine Möglichkeit ist die Kombination von Nitrosoharnstoffen mit Podophyllotoxinderivaten wie Teniposid (VM26) oder Etoposid (VP16). Diese Substanzen hemmen die Topoisomerase II und führen so zu Doppelstrangbrüchen.

Ein weiteres Schema besteht aus Procarbazin, CCNU und Vincristin (abgekürzt: PCV). Vincristin ist ein hydrophiles Vincaalkaloid, welches als Mitosespindelgift wirkt und zu einer Synchronisation des Zellzyklus der Tumorzellen führt und somit die Wirksamkeit der Alkylanzien verbessert.

Als vergleichsweise neue Substanz steht mit Temozolomid (TMZ, Temodal) ein weiteres Alkylanz für die Gliomtherapie zur Verfügung. Aufgrund seiner vergleichsweise geringen Nebenwirkungen und seiner nachgewiesenen Wirksamkeit hinsichtlich der medianen Überlebenszeit (z.B. EORTC-Studie 26981–22981), wird Temozolomid inzwischen in vielen Situationen als Therapie der 1. Wahl angesehen (*Stupp et al., 2005*).

Protokoll	Dosierung
ACNU, BCNU, CCNU	Verschiedene Schemata
PCV	Procarbazin 60 mg/m ² p.o. D 8 – D 21 CCNU 110 mg/m ² p.o. D 1 Vincristin 1,4 mg/m ² i.v. D 8 + D 29 x (6-) 8 Wochen
ACNU (Nimustin) / VM26 (Teniposid)	ACNU 90 mg/m ² i.v. D 1 VM 26 60 mg/m ² i.v. D 1 – D 3 x 6 Wochen
Temozolomid	Temozolomid 150 – 200 mg/m ² p.o. x 4 Wochen

Tabelle 3: Chemotherapie-Protokolle in der Gliomtherapie (*nach Diener et al., 2008*)

Im Folgenden werden die spezifischen Therapieempfehlungen für die, in dieser Arbeit untersuchten, diffus infiltrierenden Astrozytome der verschiedenen WHO-Grade dargestellt.

Therapie des diffusen Astrozytoms (WHO-Grad II)

In der MRT- und CT-Diagnostik stellen sich diffuse Astrozytome als weniger umschriebene fokale Signal- bzw. Dichteänderungen dar. Nur in ca. 20% der Fälle wird im MRT eine Kontrastmittelaufnahme beobachtet, die Mehrheit der Tumoren zeigt diese Eigenschaft aber nicht. Ein perifokales Ödem ist nur selten abgrenzbar (Weller *et al.*, 2004). In ca. 15 – 20% der Fälle werden radiologisch Kalzifizierungen gefunden. Obwohl der überwiegende Teil der diffusen Astrozytome nur einen geringen Masseneffekt auf angrenzende Strukturen aufweist, können auch verhältnismäßig große Tumoren bei Patienten ohne neurologische Ausfälle nachgewiesen werden. Dieser Umstand ist im Wesentlichen auf das langsame Wachstum dieser Neoplasien zurückzuführen (Tonn *et al.*, 2006).

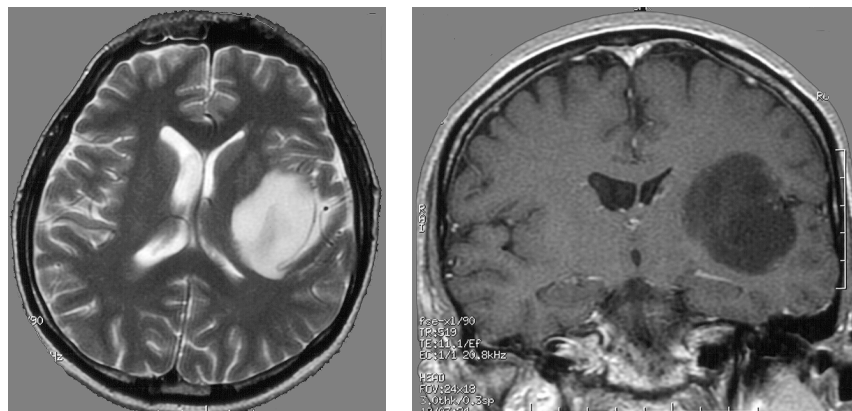


Abbildung 7: MRT-Bilder eines Patienten mit einem linksseitigen diffusen Astrozytom. (Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Marburg)

Die Befürchtung, dass eine frühe chirurgische Intervention und Strahlentherapie den malignen Progress eines diffusen Astrozytoms zu einem höhergradigen Tumor begünstigt, führte zu lang andauernden Kontroversen bezüglich des günstigsten Zeitpunktes für eine Operation. Die EORTC-Studien 22844 und 22845 konnten diese Hypothesen jedoch widerlegen (Karim *et al.*, 1996; Karim *et al.*, 2002). Demzufolge sollte der Versuch einer frühzeitigen radikalen Resektion unter Beachtung des Grundsatzes, dass durch einen operativen Eingriff neue neurologische Defizite unbedingt zu vermeiden sind, unternommen werden (Berger *et al.*, 1994). Dabei ist aber darauf hinzuweisen,

dass dieser Eingriff aufgrund des infiltrativen Wachstums der diffusen Astrozytome keinen kurativen Ansatz besitzt. Eine frühe Resektion wird häufig als vorbeugende Maßnahme zur Prävention schwerwiegender, irreversibler neurologischer Defizite und therapierefraktärer Krampfleiden durchgeführt. Ein abwartendes Verhalten kann aber ebenso gerechtfertigt sein.

Zwar war es in großen Studien bis jetzt nicht möglich einen positiven Effekt einer anschließenden Strahlentherapie auf die Fünf- und Zehnjahresüberlebenszeit nachzuweisen, trotzdem konnte eine verbesserte lokale Tumorkontrolle belegt werden (*Karim et al., 2002*). Je nach Bestrahlungsvolumen werden Dosen zwischen 45 Gy und 54 Gy empfohlen.

Eine Chemotherapie ist in der Primärtherapie der diffusen Astrozytome nicht indiziert, sie sollte jedoch im Falle eines Rezidivs nach Strahlentherapie erwogen werden. Am gebräuchlichsten ist hier vor allem das PCV-Schema, wobei in letzter Zeit auch zunehmend Temozolomid verwandt wird. Ergebnisse kontrollierter Studien liegen hier noch nicht vor. Zusätzlich sollten bei einem Rezidiv eine erneute operative Intervention, sowie, unter genauer Indikationsstellung, eine erneute Strahlentherapie in Betracht gezogen werden (*Diener et al., 2008*).

Therapie des anaplastischen Astrozytoms (WHO-Grad III)

Anaplastische Astrozytome stellen sich in der CT-Untersuchung als raumfordernde Prozesse mit inhomogener Dichteverteilung und in der T2-gewichteten MRT-Untersuchung als hyperintense Tumoren dar. Verglichen mit den diffusen Astrozytomen zeigen anaplastische Astrozytome meist ein deutliches Kontrastmittelenhancement, sowie ein abgrenzbares perifokales Ödem. Im Angiogramm können pathologische Gefäße nachweisbar sein (*Weller et al. 2004; Tonn et al. 2006*).

Die Standardtherapie des anaplastischen Astrozytoms besteht in der Resektion oder Biopsie mit anschließender Strahlentherapie. Die angestrebte Gesamtdosis beträgt 60 Gy, appliziert in Einzeldosen von 1,8 bis 2 Gy (*Laperriere et al., 2002*). Metaanalysen legen die Wirksamkeit einer adjuvanten Chemotherapie mit Nitosoharnstoffen als Bestandteil der Primärtherapie nahe. So zeigte zum Beispiel die NOA-01-Studie bei Anwendung einer ACNU-

basierten Kombinationstherapie eine mediane Überlebenszeit von fast 5 Jahren (NOA, 2003). Als günstige Prognosefaktoren gelten zusätzlich niedriges Alter (ca. < 40 – 50 Jahre) mit hohem Karnofsky-Index.

Bei dem Auftreten eines Rezidivs sollte zunächst eine erneute Operation, sowie unter Umständen, eine erneute hypofraktionierte Strahlentherapie geprüft werden. In jedem Fall konnte für Rezidive die Wirksamkeit einer Chemotherapie nachgewiesen werden. Etwa gleichwertige Regimes dürften die Nitrosoharnstoff-Monotherapie, die PCV-Chemotherapie (Levin *et al.*, 1990), die Kombination aus ACNU und Teniposid (VM26) (Weller *et al.*, 2003) und Temozolomid (Wong *et al.*, 1999) sein. Zwei unterschiedliche Verfahrensweisen sind gebräuchlich, zum einen kann bei einer kompletten oder partiellen Remission, die Chemotherapie nach vier Zyklen Nitrosoharnstoff-haltiger Therapie bzw. acht Zyklen Temozolomid pausiert werden. Zum anderen wird teilweise aber auch die Therapie bis zu einer erneuten Progression oder bis zur protrahierten Myelosuppression fortgesetzt (Diener *et al.*, 2008).

Therapie des Glioblastoms (WHO-Grad IV)

Glioblastome stellen sich in der CT- und MRT-Untersuchung in der Regel als kontrastmittelaufnehmende raumfordernde Prozesse von inhomogener Struktur dar, die als Folge regressiver Veränderungen oft ein ausgedehntes perifokales Ödem umgibt. Im Angiogramm findet sich eine pathologische Vaskularisierung, häufig mit früher venöser Drainage (Weller *et al.*, 2004).

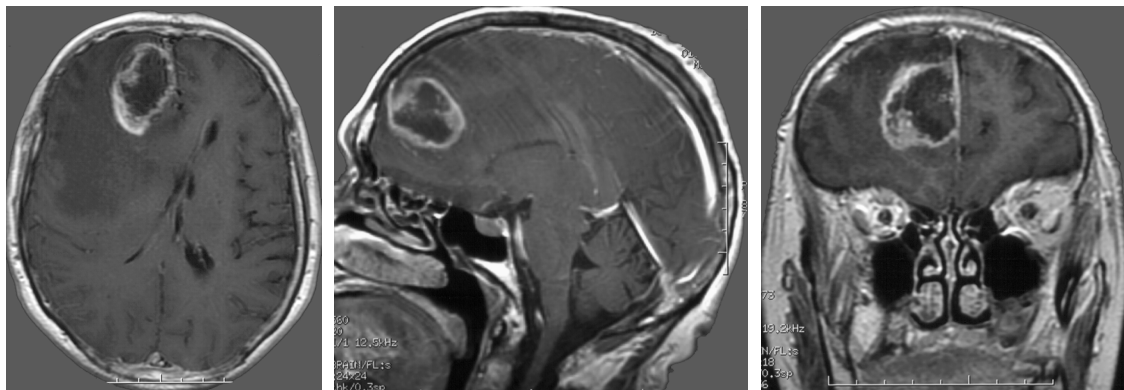


Abbildung 8: MRT-Bilder eines Patienten mit einem rechts-frontal gelegenen Glioblastom. (Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Marburg)

Die Wirksamkeit einer maximalen Tumorresektion gegenüber einer alleinigen Strahlentherapie konnte bis heute zwar nicht im Rahmen adäquater Studien nachgewiesen werden, dennoch zeigen viele Daten, dass das Ausmaß der Resektion, neben dem Patientenalter und dem allgemeinen klinischen Zustand, als positiver Prädiktor für die Überlebenszeit fungiert (*Laws et al., 2003; Hentschel et al., 2003*). Neuere Daten einer randomisierten Multizenterstudie zeigen, dass die fluoreszenzgestützter Resektion maligner Gliome sowohl die Rate an Komplettresektionen, definiert mittels postoperativem MRT, als auch das progressionsfreie Überleben nach 6 Monaten verbessert. Diese Ergebnisse implizieren ebenfalls eine Korrelation zwischen Resektionsausmaß und klinischem Verlauf (*Stummer et al., 2006*).

Die Strahlentherapie hat auch in der Therapie des Glioblastoms einen festen Platz. Für eine Dosierung von 54 – 60 Gy (1,8 – 2 Gy-Fraktionen) konnte eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von ca. sechs Monaten beobachtet werden (*Laperriere et al., 2002*). In rein palliativen Situationen kann die Strahlentherapie zur Verkürzung der Gesamtbehandlungszeit auch in akzelerierter Form erfolgen (*Roa et al., 2004*).

In Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass in der Primärtherapie von Glioblastomen die Kombination der Strahlentherapie mit einer Chemotherapie mit Nitrosoharnstoffen zu einer Verlängerung der medianen Überlebenszeit um zwei bis drei Monate führt (*Fine et al., 1993*). Gängige Praxis war bis zum Jahre 2005 der Einsatz einer Kombination aus ACNU und VM26 oder ACNU und Ara-C vor allem bei jüngeren Patienten mit günstigen Prognosefaktoren. Seit der Veröffentlichung der Ergebnisse der EORTC-Studie 26981–22981 gilt jedoch die Kombination aus Strahlentherapie mit konkomitanter und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid als neuer Standard in der Primärtherapie von Glioblastomen. Temozolomid verlängerte die mediane Überlebenszeit von 12,1 Monate auf 14,6 Monate und erhöhte die 2-Jahres-Überlebensrate von 10% auf 26% (*Stupp et al., 2005*).

Für die Therapie von Rezidivtumoren ist grundsätzlich eine erneute operative Versorgung in Erwägung zu ziehen. Der positive Effekt einer Chemotherapie auf das progressionsfreie Intervall und das progressionsfreie Überleben ist in Metaanalysen verschiedener Phase-II-Rezidivstudien belegt (*Wong et al.,*

1999). Auch hier scheint die Therapie mit Temozolomid einer Gabe einer nitrosoharnstoff-haltigen Chemotherapie bezüglich des progressionsfreien Überlebens überlegen zu sein (*Wick et al., 2007*), es fehlen jedoch zur Zeit noch Ergebnisse großer prospektiver Studien.

Ähnlich wie bei der Therapie eines Rezidivs eines anaplastischen Astrozytome kann auch bei der Therapie eines Glioblastom-Rezidivs, abhängig vom genutzten Chemotherapeutikum, entweder die Chemotherapie bei kompletter oder partieller Remission unterbrochen werden oder bis zum Auftreten eines Progress oder relevanter Myelosuppression fortgeführt werden. Auch bei Rezidiven eines Glioblastoms kann eine hypofraktionierte Nachbestrahlung erwogen werden (*Diener et al, 2008*).

Supportive Therapie

Die präoperative Behandlung der peritumoralen raumfordernden Hirnschwellung, sowie die Prophylaxe bzw. Reduktion eines manipulationsbedingten postoperativen Hirnödems besitzen eine besondere Relevanz in der Therapie der Gliome. Mittel der Wahl sind hierbei Kortikosteroide insbesondere Dexamethason. Ihr positiver Effekt kann durch die Gabe von osmotisch wirksamen Substanzen (Mannitol, Glycerol) noch unterstützt werden. Aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen einer chronischen Behandlung mit Kortikosteroiden, sollte innerhalb der ersten Wochen nach der Operation die Steroide ausgeschlichen werden. Sollte dies in den ersten Wochen nicht möglich sein oder sollte im Rahmen einer anschließenden Strahlentherapie eine Hirnödemprophylaxe notwendig sein, so ist zumindest eine Dosisreduktion anzustreben. In der Folge muss die Indikation zur Fortführung der Kortikosteroidtherapie immer wieder kritisch überprüft werden (*Diener et al., 2008*).

Patienten mit Tumoren, die mit Krampfanfällen symptomatisch wurden, sollten prä- und perioperativ antikonvulsiv behandelt werden. Hierzu können zum Beispiel Carbamazepin, Valproinsäure und Phenytoin eingesetzt werden. Treten postoperativ keine weiteren Krampfanfälle auf, so kann auch hier spätestens nach drei Monaten ein Ausschleichen der antikonvulsiven Therapie

versucht werden. Fortlaufende Krampfanfälle machen in der Regel eine dauerhafte Antikonvulsivatherapie erforderlich (*Wick et al, 2005*).

Patienten mit Gliomen weisen postoperativ ein erhöhtes Thrombose- und Embolierisiko auf (*Marras et al., 2000*). Dies ist am ehesten auf eine Veränderung spezifischer Gerinnungseigenschaften im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms zurückzuführen. Da die Gefahr intracerebraler Blutungen bei antikoagulierten Gliompatienten nicht signifikant erhöht ist, sollte eine Behandlung mit niedermolekularen fraktionierten Heparinen in Betracht gezogen werden.

Die psychosoziale Diagnostik und Unterstützung von Patienten und deren Angehörigen ist ein unverzichtbarer Bestandteil der Behandlung aller Patienten. Bei Feststellung behandlungsbedürftiger psychischer Komorbidität ist eine qualifizierte und angemessene psychotherapeutische und ggf. medikamentöse Behandlung indiziert (*Weitzner, 1999*).

Nach Abschluss der tumorspezifischen Therapie ist die Indikation für eine Rehabilitationsbehandlung zu prüfen. Je nach körperlicher Verfassung, sozialer Situation und Prognose des Patienten kommt eine stationäre, teilstationäre oder ambulante Rehabilitation in Frage. Dabei steht die Verbesserung der neurologischen und neuropsychologischen Defizite im Fokus der Rehabilitationsmaßnahmen (*Weller et al., 2004*).

Im der Terminalstadium der Tumorerkrankung ist eine kompetente palliativmedizinische Betreuung des Patienten erforderlich. Grundlegend sind dabei der Einsatz von Antiemetika, Kortikosteroiden und Antikonvulsiva. Unter Umständen ist auch eine Flüssigkeitssubstitution erforderlich. Vor allem in der Endphase der Erkrankung ist die regelmäßige und ausreichende Gabe von Opiaten indiziert, begleitend kann auch der Einsatz von Sedativa notwendig werden. Die Linderung von Schmerzen und anderen Symptomen hat in dieser Situation Vorrang vor den möglichen Nebenwirkungen dieser Medikamente. Unverzichtbar ist in dieser Situation auch eine intensive psychosoziale

Unterstützung des Patienten und seiner Angehörigen durch palliativmedizinisch spezialisierte Ärzte, Pflegedienste und Hospizhelfer (*Weller et al., 2004*).

1.3 IL13R α 2 (Interleukin-13 Receptor alpha-2)

Das Gen IL13R α 2 ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms am Genlokus q24 lokalisiert. Synonym verwendete Namen sind IL13BP und IL13R. Es codiert für ein 65 kDa großes Protein, das sich aus 380 Aminosäuren zusammensetzt. Dieses Protein stellt eine der drei möglichen Untereinheiten des Interleukin-13 (IL-13) Rezeptors dar.

Interleukin-13 (IL-13) ist ein Cytokin, das im menschlichen Körper eine Vielzahl von Aufgaben hat. Einer der zuerst verifizierten Effekte von IL-13 war die modulierende Wirkung auf Entzündungsreaktionen durch einen negativen Effekt auf die Produktion von anderen inflammatorischen Cytokinen. Mittlerweile weiß man aber, dass dies nur eine der vielen biologischen Aufgaben ist, die IL-13 besitzt. So spielt IL-13 z.B. eine Rolle bei allergischen Reaktionen, bei der Produktion von IgE-Antikörpern, bei der Bekämpfung parasitärer Infektionen, bei Umbauvorgängen des Gewebes und auch bei der Regulierung des Wachstums von Tumorzellen (*Wynn, 2003*).

Der für die Interaktion von IL-13 mit der jeweiligen Zelle benötigte Rezeptor, kann aus unterschiedlichen Ketten aufgebaut sein. Neben der IL13R α 2-Kette, sind die IL13R α 1- und die IL-4R α -Kette weitere mögliche Untereinheiten (*Zurawski et al., 1995*).

Als erste Untereinheit wurde die IL13R α 1-Kette von Mäusen und Menschen isoliert. Die IL13R α 1-Kette bindet IL-13 mit einer niedrigen Affinität, bildet aber zusammen mit der IL4R α -Kette ein Heterodimer, das IL-13 dann mit hoher Affinität bindet (*Aman et al., 1996*). IL-13 wirkt nach der Bindung an diesen Rezeptorkomplex, über eine phosphorylierungs-abhängige Aktivierung der Janus-Kinase 1 und 2, Tyk2 und STAT6 (signal transduction and activator of transcription 6), proliferations-fördernd (*Kawakami et al., 2001*).

Die IL13R α 2-Kette wurde zuerst aus der Nierenzellkarzinom-Zelllinie Caki-1 isoliert. Sie besitzt auf der DNA-Ebene ca. 50% Homologie zum IL-5R Protein, hat eine sehr kurze intrazelluläre Domäne und ist in der Lage selbstständig IL-13 mit einer ca. 50-mal größerer Affinität zu binden als IL13R α 1 (*Caput et al., 1996; Donaldson et al., 1998; Puri et al., 1996*). *Kawakami et al. (2001)* konnten nachweisen, dass es nach der Bindung mit dem Liganden zu einer Internalisierung des IL-13 / IL13R α 2 – Komplexes kommt, die für die anderen Varianten des IL-13 Rezeptors nicht beobachtet wurde. Der physiologische Effekt dieser Interaktion ist bis jetzt jedoch unklar.

Eine IL13R α 2-Expression konnte in einer Vielzahl von Zelllinien und primären Zellkulturen humaner Karzinome nachgewiesen werden, so z.B. im AIDS-assoziierten Karposi-Sarkom (*Husain et al., 1997*), in Ovarialkarzinomen (*Murata et al., 1997*) und Nierenzellkarzinomen (*Caput et al., 1996*), aber auch in Fibroblasten (*Murata et al., 1998*). Interessanterweise scheint die Rezeptorkette aber gar nicht oder nur auf einem äußerst niedrigen Level in gesunden Endothelzellen, Immunzellen und einigen speziellen Tumoren exprimiert zu werden. Dennoch implizieren diese Beobachtungen, dass IL13R α 2 in die Onkogenese einiger Tumoren involviert ist (*Kawakami et al., 2001*).

Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist, dass mehrere Autoren eine IL13R α 2-Überexpression in astrozytären Tumoren und vor allem in Glioblastomen nachweisen konnten. Dies traf sowohl für Tumore von erwachsenen Patienten, als auch auf Kinder zu (*Debinski et al., 1999; Joshi et al., 2000; Mintz et al., 2002*). Beispielsweise zeigten *Kawakami et al. (2004)* in einer Serie an kindlichen hochgradigen Astrozytomen, dass 100% der untersuchten Tumore IL13R α 2 stark exprimierten, bei den niedriggradigen Astrozytomen waren es 79%.

Kawakami et al. (2001) zeigten, dass die vektorinduzierte Überexpression von IL13R α 2 im Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion der Wachstumsrate von Tumoren aus der humanen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, sowie der Pankreaszelllinie PANC-1 führte. Dabei wurde beobachtet, dass die

Anwesenheit von Entzündungszellen, besonders von Neutrophilen mit dem reduzierten Wachstum des Tumors korrelierte. Neutrophile produzieren IL-13, wobei gezeigt werden konnte, dass IL-13 einen moderaten antitumorösen Effekt auf IL13R α 2 exprimierende Malignome hat. Darüber hinaus produzieren diese Malignome auch große Mengen an IL-8, für das in verschiedenen Modellen ebenfalls ein supprimierender Effekt auf Tumorzellen gefunden wurde.

Rahaman et al. (2002) postulierten für den IL13R α 2-Rezeptor eine Funktion als Blindrezeptor für IL-4. IL-4 und IL-13 stimulieren oder reduzieren gewebespezifisch die Zellproliferation. In Astrozyten und niedriggradigen Astrozytomen bewirkt IL-4 eine Wachstumsreduktion. In gesunden Gliazellen bewirkt IL-4 über eine p21-abhängige Hochregulierung von p27 (Kip1) einen antimitotischen Effekt. In astrozytären Tumoren ist das p27 Protein weniger stark vorhanden, was auf einen fehlenden inhibitorischen Effekt durch IL-4 hinweist.

Die Tatsache, dass IL13R α 2 von den Zellen vieler humaner Tumoren inklusive Glioblastomen überexprimiert wird und dass diese hohe Expression in gesundem Gewebe, also auch in normalem Hirngewebe, nicht zu finden ist, führte zu der Annahme, dass diese Struktur als Ziel einer tumorspezifischen Chemotherapie genutzt werden könnte. *Debinski et al. (1995)* zeigten als Erste den toxischen Effekt eines chimären Proteins, zusammengesetzt aus IL-13 und einem Derivat des Pseudomonas-Exotoxins (IL13-PE38QQR), auf Gliomzelllinien. Schnell konnte gezeigt werden, dass dieser zytotoxische Effekt speziell auf die IL13R α 2-Kette zurückzuführen war, da diese neben der hohen Affinität zu ihrem Liganden auch für die Internalisierung des IL13-PE38QQR und anderer getesteter Zytotoxine verantwortlich ist (*Kawakami et al., 2005; Kioi et al., 2006; Madhankumar et al., 2004; Mintz et al., 2003*).

Durch die Verwendung einer mutierten Variante von IL-13, welche eine strukturelle Veränderung in dem Bereich aufweist, der mit der IL-4 α R-Komponente des IL13R α 1 / IL-4 α R Dimers interagiert, konnte für das Zytotoxin sogar eine noch größere Tumorspezifität erzielt werden (*Debinski et al., 1998*).

In weiteren Studien zeigten *Kawakami et al. (2002)*, dass die intratumorelle Applikation des IL-13 Zytotoxins in Gliome, die durch Transplantation von

Tumorzellen in die Bauchhöhle von Tieren gewachsen waren, einen antitumorösen Effekt hervorruft, der durch die Apoptose der Tumorzellen bedingt wird. Auch die intravenöse und intraperitoneale Applikation zeigte diesen Effekt, jedoch in abgeschwächter Form.

Nach der Beendigung viel versprechender präklinischer Sicherheits- und Toxizität-Studien an Mäusen, Ratten und Affen wurde mit der Durchführung einer Reihe von klinischen Phase I/II-Studien begonnen um die Wirksamkeit und Einsetzbarkeit von IL13-PE38QQR für therapeutische Zwecke zu erforschen. Die erste dieser Studien beinhaltet die intratumorelle Applikation des Zytotoxins in Glioblastomrezidive mittels eines Katheters (convectional-enhanced delivery (CED)) (*Murad et al., 2006*). Andere Studien untersuchen die Wirksamkeit des Medikamentes bei Applikation mittels CED vor bzw. nach der Resektion eines Rezidivglioblastoms (*Husain et al., 2003; Kioi et al., 2006; Kunwar et al., 2007*). Der überwiegende Teil dieser Studien befindet sich zurzeit in der Nachbeobachtungsphase, wobei das Zytotoxin selbst von den meisten Patienten relativ gut vertragen wurde.

Als erste klinische Phase III-Studie wurde die „PRECISE“-Studie durchgeführt. An insgesamt 300 Probanden wurde hierbei die Wirksamkeit von IL13-PE38QQR mit „GLIADEL“ (interstitielle BCNU-Therapie) bei der Behandlung von Patienten mit Glioblastomrezidiven verglichen. Die Studie befindet sich aktuell ebenfalls in der Nachbeobachtungsphase, jedoch zeigen erste Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Therapiemöglichkeiten. Aus diesem Grund hat das Zytotoxin in den aktuellen Leitlinien für die Therapie von Gliomen keinen Stellenwert erlangt (*Diener et al., 2008*).

1.4 OLIG2 (Oligodendrocyte transcription factor 2)

Das Gen OLIG2 ist auf dem langen Arm des Chromosoms 21 am Genlokus q22.11 lokalisiert. Synonym verwendete Bezeichnungen für OLIG2 sind BHLHB1, RACK17 und PRKCBP2.

OLIG2, sowie das nah verwandte OLIG1 codieren für Proteine, die zuerst in Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen nachgewiesen wurden (*Lu et al.,*

2000; Zhou et al., 2000). Sie stellen basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren dar, denen wichtige regulierende Funktionen bei der Differenzierung von spezialisierten Zellen des Zentralnervensystems aus neuroepithelialen Vorläuferzellen zugesprochen werden.

Zunächst wurde für OLIG2 eine spezifische Rolle bei der Differenzierung von Oligodendrozyten aus den entsprechenden Vorläuferzellen im ventralen Anteil des embryonalen Neuralrohrs nachgewiesen. Weitergehende Untersuchungen ergaben jedoch, dass der bHLH Transkriptionsfaktor ebenfalls bei der Ausbildung von Motoneuronen mitwirkt. Diese beiden Arten von neuronalen Zellen entstehen aus derselben Region des ventralen Neuralrohres, die pMN-Domäne (motoneuron precursor domain) genannt wird. Dabei läuft die Differenzierung in einer genetisch gesteuerten zeitlichen Abfolge ab (Marquardt et al., 2001).

Mizuguchi et al. (2001) und Novitsch et al. (2001) konnten immunohistochemisch an Hühnerembryonen zeigen, dass die Coexpression von Olig2 und Neurogenin2 (Ngn2) in den Vorläuferzellen für Motoneurone entscheidend für deren weitere Differenzierung ist. Der Transkriptionsfaktor Pax6 scheint an dieser Stelle für die Initiierung der Coexpression beider Proteine verantwortlich zu sein. Dabei begrenzt Olig2 über die Aktivierung von Ngn2 die Anzahl von Zellzyklusdurchläufen von Motoneuronvorläufern. Gleichzeitig wirkt Olig2 dabei negativ auf die Expression von Irx3, das wiederum einen starken Repressor gegen die Entwicklung von Motoneuronen darstellt. Zusätzlich spielen in diesem Prozess die Proteine Nkx6.1 und Nkx6.2 eine entscheidende Rolle, da sie für die Initiierung der Olig2-Expression zuständig sind (Liu et al., 2003).

Im weiteren Verlauf der embryonalen Entwicklung kommt es dann in den Zellen der pMN-Domäne neben einer verstärkten Expression von OLIG2 auch zu einem Anstieg von weiteren oligodendrozyten-spezifischen Genen, wie z.B. PDGFRA und SOX10. Dabei wirkt OLIG2 in Verbindung mit Nkx2.2 fördernd auf die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläufer. Zusammen bewirken sie zusätzlich eine Herunterregulierung der Neurogenin2 Expression (Zhou et al., 2001). Nachdem die Differenzierung stattgefunden hat, migrieren die Vorläuferzellen zügig in die umliegende weiße und graue Substanz, wo es zu der weiteren Differenzierung zu Oligodendrozyten und zur Proliferation kommt (Marquardt et al., 2001).

In einer neueren Studie unterstrichen *Lee et al. (2005)* erneut die Schlüsselfunktion von Olig2 und Ngn2 für die Differenzierung der Vorläuferzellen der pMN-Domäne. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Olig2 zwar die Expression von Ngn2 aktiviert, im weiteren Verlauf wirken die beiden Proteine aber antagonistisch. Entscheidend für die weitere Differenzierung zu Motoneuron- oder Oligodendrozyten-Vorläufern scheint dabei das relative Verhältnis zwischen Olig2- und Ngn2-Expression zu sein. Vorläuferzellen in denen Ngn2 stärker exprimiert wird, differenzieren zu Motoneuronen, Zellen mit einer höheren Olig2-Expression zu Oligodendrozyten. Es wird vermutet, dass Olig2 über diesen Mechanismus verhindert, dass während der Phase der Motoneurondifferenzierung alle pluripotenten Vorläuferzellen der pMN-Domäne zu Motoneuronvorläuferzellen werden.

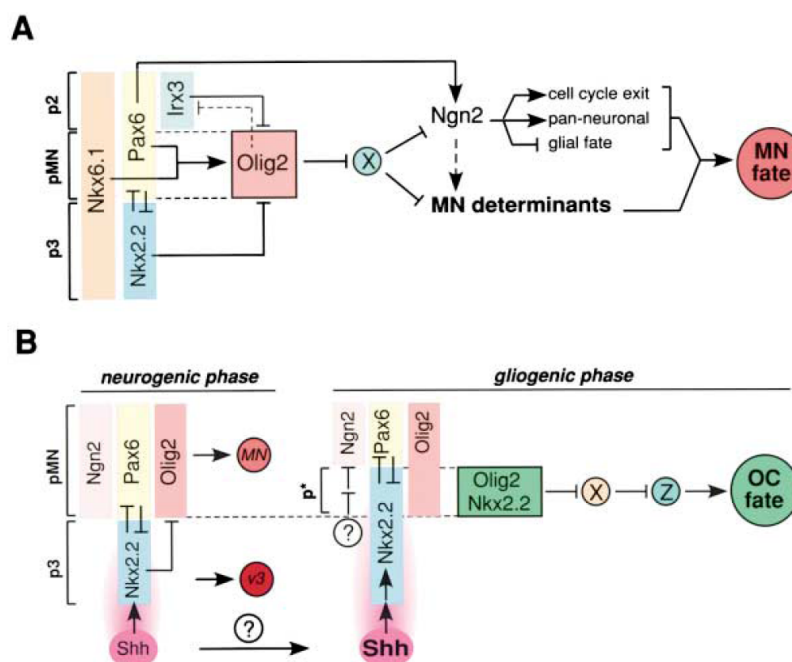


Abbildung 9: Olig2 führt zunächst zur Bildung von Motoneuronen (MN) und unterstützt anschließend die Oligodendrozytendifferenzierung in den Vorläuferzellen des Neuralrohrs.

(A) Olig2 aktiviert die MN-Determinanten (z.B. MNR2, Lhx3, Isl1/2 und HB9) über die Unterdrückung von Irx3 und einem unbekannten Faktor X. Die Aktivität von Ngn2 wird durch Olig2 indirekt gesteigert und fördert so zusätzlich die neuronale Differenzierung, sowie den Zellzyklusstop. Die Olig2-Expression wird gesteigert von Nkx6.1 und Pax6, ein negativer Effekt wird durch Nkx2.2 und Irx3 vermittelt.

(B) Der Wechsel von der Motoneuron- zur Oligodendrozytendifferenzierung wird möglicherweise ausgelöst durch eine passagere Steigerung der Shh-Aktivität. Die Koexpression von Olig2 und Nkx2.2 kennzeichnet jetzt die Zone des Neuralrohrs aus der Oligodendrozyten entstehen. Dabei sind die Zielstrukturen der kombinierten Olig2- und Nkx2.2-Expression noch unbekannt.

(Abbildung entnommen aus: Marquardt T. et Pfaff S.L., 2001)

Die Relevanz von OLIG2 für die Differenzierung von Motoneuronen und Oligodendrozyten aus den Vorläuferzellen der pMN-Domäne konnten *Lu et al. (2002)* durch ein weiteres Experiment untermauern. Dabei züchteten sie knockout Mäuse für OLIG2. Während der embryonalen Entwicklung kam es bei diesen Tieren zu keiner Ausbildung von Motoneuronen oder Oligodendrozyten, dafür aber zu einer vermehrten Bildung von V2-Interneuronen. *Zhou et al. (2002)* beobachteten in einem ähnlichen Experiment, dass double-knockout Mäuse für OLIG1 und 2 zusätzlich zu der gesteigerten Bildung von V2-Interneuronen ein vermehrtes Auftreten von Astrozyten aufwiesen.

Die Beobachtung, dass es bei einer fehlenden Expression von OLIG2 zu einem verstärkten Auftreten von Astrozyten kommt, könnte mit Hilfe der Forschungsergebnisse von *Fukuda et al. (2004)* erklärt werden. Diese Arbeitsgruppe ermittelte, dass OLIG2 einen negativen regulatorischen Effekt auf die Astrozytendifferenzierung hat. OLIG2 verhindert dabei die Komplexbildung zwischen dem Transkriptions-Coaktivator p300 und STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). Aufgrund dieser fehlenden Komplexbildung wird die Expression des GFAP, einem wichtigen Promotor der Astrozytendifferenzierung verhindert. In diesem Zusammenhang untersuchten *Setoguchi et al. (2004)* die Verteilung des Olig2-Proteins in neuronalen Stammzellen und differenzierten Astrozyten. Dabei stellten sie fest, dass in den Stammzellen Olig2 im Nukleus nachweisbar war, in Astrozyten jedoch nur noch im Zytoplasma. Sie äußerten die Vermutung, dass Olig2 im Zellkern über den oben genannten Mechanismus die Differenzierung zu Astrozyten blockiert und erst die Translokation von Olig2 in das Zytoplasma mit Hilfe von aktivierter AKT Kinase die weitergehende Differenzierung ermöglicht.

In der Hoffnung einen molekularen Marker zu finden, der eine einfache und sichere Unterscheidung zwischen oligodendroglialen und astrozytären Tumoren ermöglicht, untersuchten *Lu et al. (2001)* mittels in-situ Hybridization eine Serie von 23 Proben von verschiedenen humanen Gliomen auf die Expression von OLIG2 mRNA. Dabei zeigten die untersuchten Oligodendrogliome gegenüber gesundem Hirngewebe eine stark gesteigerte Expression, wohingegen in Astrozytomen und Glioblastomen nur eine schwache oder keine OLIG2-Expression nachzuweisen war. In anderen nicht-glialen Hirntumoren, wie z.B.

Meningiomen war eine OLIG2-Expression ebenfalls nicht messbar. Ähnliche Ergebnisse brachten auch die Untersuchungen von *Marie et al. (2001)* an 21 Tumorproben. Jedoch ergaben weitere Experimente von *Aguirre-Cruz et al. (2004)* an 78 Tumorproben, das sich mittels in-situ Hybridization nicht nur in oligodendroglialen Neoplasien, sondern auch in der überwiegenden Zahl an untersuchten Astrozytomen des WHO-Grad II und III eine OLIG2-Expression nachweisen ließ. In Glioblastomen war die Expression allerdings nur selten nachzuweisen. Nicht-gliale Tumoren wiesen aber auch in dieser Untersuchung keine OLIG2-Expression auf. Eine weitere Studie zur Expressionsbestimmung von OLIG2 mRNA in oligodendroglialen und astrozytären Tumoren mittels real-time RT-PCR führten *Riemenschneider et al. (2004)* durch. Auch diese Arbeitsgruppe fand eine OLIG2-Expression in allen untersuchten Malignitätsgraden beider Gruppen von Tumoren, wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten nicht signifikant waren.

Yokoo et al. (2004) nutzten in einer weiteren Studie Antikörper gegen das humane Olig2-Protein, um sein Vorkommen in verschiedenen Normalhirn- und Tumorproben zu testen. Dabei ließen sich in gesundem Gehirngewebe die Kerne der interfazikulären, perivaskulären und der perineuronalen Oligodendrozyten spezifisch markieren. Außerdem färbten sich die Kerne von Oligodendrogliomen auch positiv, wobei die Intensität der Färbung aber keinen Rückschluss auf den histologischen Grad des Tumors ermöglichte. Astrozytäre Tumoren zeigten ebenfalls eine Färbung für das Olig2-Protein, diese war jedoch im Vergleich zu der Intensität bei den Oligodendrogliomen schwächer.

Auch *Ligon et al. (2004)* fanden in ihren Untersuchungen mittels Immunohistochemie und Microarray eine universelle OLIG2-Expression in oligodendroglialen und astrozytären Tumoren, wobei aber den einzelnen Entitäten kein signifikant unterschiedliches Expressionsverhalten zugeordnet werden konnte. Deshalb beschrieben sie OLIG2 zwar als sinnvollen Marker für diffuse Gliome, jedoch nicht als Marker zu einer weiteren sicheren Unterteilung dieser großen Gruppe.

In einer aktuellen Studie äußerten *Mokhtari et al. (2005)* jedoch die Vermutung, dass die OLIG2-Expression zusammen mit einer Betrachtung von GFAP, p53 und 1p-Verlust zur Unterteilung der Gliome in Untergruppen genutzt werden könnte. In ihren immunohistochemischen Analysen bestätigten sie die bereits

zuvor gemachte Beobachtung, dass die Olig2-Expression in reinen Oligodendrogliomen wesentlich höher ist, als in Oligoastrozytomen und Astrozytomen. Gleichzeitig ermittelten sie auch, dass die Olig2-Expression in den WHO-Grad III Tumoren jeder Gruppe im Vergleich zu den WHO-Grad II Tumoren signifikant höher ist. Die niedrigste Olig2-Expression fanden sie in Glioblastomen.

1.5 DBCCR1 (Deleted in Bladder Cancer Candidate Region 1)

Das Gen DBCCR1 ist auf dem Chromosom 9 am Genlokus q32-33 lokalisiert. Es codiert für ein 761 Aminosäuren großes Protein mit einer ungefähren Masse von 100 kDa, dass hauptsächlich im Zytoplasma zu finden ist (*Nishiyama et al., 2001*). DBCCR1 wird eine Funktion im Sinne eines Tumorsuppressorgens zugesprochen.

Deletionen von Teilen oder des gesamten Chromosom 9 zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Harnblasentumoren. Der Verlust an genetischem Material wird in der Regel als Verlust der Heterozygotie (LOH) wahrgenommen und bedingt häufig die funktionelle Inaktivierung betroffener Gene. *Habuchi et al (1997)* beobachteten zwei häufige Deletionen in Harnblasentumoren. Diese betrafen sowohl den kurzen, als auch den langen Arm des Chromosoms 9, was wiederum auf die Beteiligung von zwei unabhängigen Genen hindeutete. Zum einen wurde die Inaktivierung des multipotenten Tumorsuppressors CDKN2A auf 9p beobachtet, zum anderen war auf 9q der Lokus 9q32-33 von einem Verlust der Heterozygotie betroffen. Da dieser Bereich das Gen DBCCR1 einschließt, wurde die These formuliert, dass es sich hierbei um ein Tumorsuppressorgen handeln könnte, dessen fehlende Expression eine Rolle bei der Entstehung von Harnblasentumoren spielt.

In weiteren Experimenten untersuchten *Habuchi et al. (1998)* die DBCCR1 Expression in Harnblasentumoren und normalem Gewebe weiter und fanden, dass in vielen Harnblasentumoren die Expression herunterreguliert war. Mit Hilfe von Demethylierungs-Reagenzien war es in-vitro jedoch möglich, die

Expression zu induzieren. Dies war ein wichtiger Hinweis dafür, dass neben dem LOH auch die Hypermethylierung der 5' CpG-Insel, also der Promotorregion von DBCCR1 für die niedrigere Expression verantwortlich ist.

Diese Ergebnisse wurden von mehreren Autoren in den folgenden Jahren bestätigt, so fanden *Nishiyama et al. (1999)* eine homozygote Deletion von 9q32-33 speziell in papillären Harnblasentumoren. *Stadler et al. (2001)* zeigten ebenfalls mittels fluoreszenz in-situ Hybridisierung, dass der Bereich 9q33 regelmäßig von Deletionen betroffen ist. Gleiches gilt für *Wada et al. (2003)*.

Nishiyama et al. (2001) führten weitere Untersuchungen durch, um den Wirkmechanismus von DBCCR1 zu entschlüsseln. Dabei konnten sie zeigen, dass die Transfektion von NIH3T3-Zellen mit DBCCR1 zu einer reduzierten Proliferation führt. Dabei scheint DBCCR1 Einfluss auf den Zellzyklus zu nehmen. Die behandelten Kulturen zeigten eine Akkumulation von Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus und eine Verminderung von Zellen in der S und G₂/M-Phase. Dieses Ergebnis konnte auch in Zelllinien aus Harnblasentumoren reproduziert werden, was zu der Annahme führte, dass DBCCR1 regulierende Einflüsse auf den Zellzyklus besitzt. DBCCR1 wirkt dabei aber nicht wie z.B. das klassische Tumorsuppressorgen TP53, da in dieser Studie neben der Zellzyklusmodulation keine erhöhte Apoptoserate zu beobachten war.

Diesen Ergebnissen von *Nishiyama et al. (2001)* stehen jedoch die Ergebnisse von *Wright et al. (2004)* zumindest teilweise entgegen. Diese Arbeitsgruppe zeigte im in-vitro Experiment, dass die Transfektion des DBCCR1-Gens mit Hilfe von Vektoren auf DBCCR1-negative, kultivierte Harnblasenkarzinomzellen, über die Expression des Gens, zum Zelltod führt. Es fiel jedoch auf, dass DBCCR1 nicht den klassischen Weg der Apoptose über die Aktivierung von Caspasen induzierte, sondern der Zelltod durch einen alternativen, noch nicht näher bekannten Weg hervorruft. Dieser Pathway fällt am ehesten unter die Bezeichnung TUNEL-negativer programmierter Zelltod.

Neben der Expressionanalyse in Harnblasentumoren wurden auch andere Malignome auf die Expression von DBCCR1 untersucht. *Goa et al. (2004)* untersuchten 34 Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle auf eine

Hypermethylierung der DBCCR1-Promotorregion und auf einen LOH für 9q33. Dabei fanden sie einen LOH bei 32% der Tumorproben und eine Hypermethylierung bei 44%. Auch hier könnte die Expressionsänderung des möglichen Tumorsuppressors DBCCR1 einen frühen Schritt zur Malignisierung darstellen.

Izumi et al. (2005) beobachteten in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen ebenfalls eine niedrige Expression von DBCCR1. Diese wurde in einigen wenigen Fällen durch eine homozygote Deletion hervorgerufen, häufiger war aber eine funktionelle Inaktivierung über die Hypermethylierung des CpG-Promotors.

Beetz et al. (2005) untersuchten mittels Real-Time PCR die Expression von DBCCR1 in Astrozytomen unterschiedlicher Malignitätsgrade. Sie analysierten insgesamt 30 Gewebeproben (8 diffuse Astrozytome, 3 anaplastische Astrozytome und 14 Glioblastome, sowie 5 Proben gesundes Gehirngewebe). Die Ergebnisse zeigten eine reduzierte Expression von DBCCR1 in allen Tumorproben gegenüber dem normalen Gehirngewebe. Dabei korrelierte die Expressionsstärke invers mit dem Malignitätsgrad. Im weiteren Verlauf untersuchte die Arbeitsgruppe 24 Tumorproben verschiedener Malignitätsgrade auf einen Verlust der Heterozygotie für 9q32-33. Dieser war aber nur in 5 Fällen nachweisbar, was zu der Hypothese führte, dass auch hier die Hypermethylierung der Promotorregion eine wichtige Rolle spielen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 51 Tumorproben von Patienten im Alter von 6 bis 79 Jahren untersucht, wobei das mediane Alter bei 54 Jahren lag. 36 Patienten waren männlichen, 15 weiblichen Geschlechts.

Bei allen Proben handelte es sich um intraoperativ gewonnenes Gewebe, welches unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert wurde. Alle operativen Eingriffe wurden durch die Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg durchgeführt. Die histopathologische Untersuchung der Proben, sowie die Einteilung nach den WHO-Kriterien in die unterschiedlichen Tumorgade erfolgte durch das Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg.

Entsprechend der WHO-Klassifizierung wurden die Tumorproben vier Gruppen zugeordnet. Die Gruppe der Astrozytomen WHO-Grad II umfasste 6 Proben, die der Astrozytome WHO-Grad III 11 Proben. Bei 23 der Tumorproben handelte es sich um primäre Glioblastoma multiforme und weiter 11 Proben entsprachen einem Rezidiv eines Glioblastoms nach vorangegangener Resektion, sowie Radiatio mit 60 Gy und Chemotherapie mit Nimustine (ACNU) und Teniposid (VM26).

Präoperativ wurde von allem Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung für die molekularbiologische Untersuchung der gewonnenen Resektate eingeholt.

Histologie	Proben-Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)
Astrozytom WHO-Grad II	67/02	Männlich	30
	08/04	Weiblich	30
	58/04	Männlich	6
	11/05	Männlich	33
	18/05	Männlich	33
	45/06	Männlich	33
Astrozytom WHO-Grad III	63/02	Weiblich	37
	21/03	Männlich	38
	37/03	Weiblich	50
	65/03	Männlich	34
	75/03	Männlich	42
	96/03	Männlich	41
	121/03	Männlich	67
	137/03	Männlich	32
	87/04	Weiblich	35
	78/05	Männlich	41
	89/05	Weiblich	38
Glioblastoma multiforme	37/02	Weiblich	54
	64/02	Männlich	65
	124/02	Männlich	62
	01/03	Männlich	64
	17/03	Männlich	72
	27/03	Männlich	73
	29/03	Männlich	64
	35/03	Männlich	48
	68/03	Männlich	79
	76/03	Männlich	66
	103/03	Männlich	49
	03/04	Männlich	52
	60/04	Weiblich	68
	10/05	Weiblich	69
	44/05	Weiblich	74
	74/05	Weiblich	72
	79/05	Männlich	63
	80/05	Weiblich	60
	83/05	Männlich	76
	103/05	Männlich	69
	119/05	Weiblich	24
	33/06	Männlich	57
	51/06	Männlich	50
Glioblastoma Rezidiv	28/03	Weiblich	49
	36/03	Männlich	67
	51/03	Männlich	64
	54/03	Männlich	61
	74/03	Männlich	64
	152/03	Weiblich	43
	153/03	Männlich	54
	47/04	Männlich	42
	76/04	Männlich	62
	04/05	Weiblich	64
	29/06	Männlich	61

Tabelle 4: Aufstellung der verwendeten Proben geordnet nach Histologie.

2.2 Geräte und Chemikalien

2.2.1 Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Camera Transilluminator	Stratagene, La Jolla, USA
Eppendorf Centrifuge 5804 mit Ausschwingrotor	Eppendorf, Hamburg
GeneQuant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
Gradient Cycler, PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Waltham, USA
Horizontal Gel Elektrophoresis System Horizon 11.14	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Mikromörser und Stößel	Carl Roth, Karlsruhe
Savant Speed Vac Concentrator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Tiefkühlschrank HERA freeze (-80°C)	Heraeus Instruments, Hanau
Tischmischer VF2 Vortex	Janke & Kunkel IKA
	Labortechnik, Staufen
Tischzentrifuge Biofuge	Heraeus Instruments, Hanau

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalkanülen BD Microlance 3	BD Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen Inject, Solo 5 ml	B. Braun, Melsungen
Optical 96 well reaction plate / Optical caps	Applied Biosystems, Darmstadt
Pipettenspitzen Filter-Tip RNase-frei 10	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen Filter-Tip RNase-frei 100	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen Filter-Tip RNase-frei 1000	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, save-lock, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

2.2.3 Chemikalien und Lösungen

123 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose, electrophoresis grade	Invitrogen, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen
Chloroform	Merck, Darmstadt
EDTA Säure	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth, Karlsruhe
Loading-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Oligo(dT ₁₈)-Primer	Operon, Köln
Tris-Acetat	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Acros Organics, Geel, Belgien
1x TAE-Puffer	0,04 M Tris-Acetat 0,001 M EDTA

2.2.4 Kits

<u>Omniscript RT Kit (50)</u>		Qiagen, Hilden	<i>Cat. No. 205111</i>
	200 units	Omniscript Reverse Transcriptase	
	150 µl	Buffer RT, 10x	
	100 µl	dNTP Mix, jeweils 5 mM	
	1,1 ml	RNase-freies Wasser	
<u>Taq PCR Core Kit (250 U)</u>		Qiagen, Hilden	<i>Cat. No. 201223</i>
	250 units	Taq DNA Polymerase	
	1,2 ml	Qiagen PCR Buffer, 10x	
	2,0 ml	Q-Solution, 5x	
	1,2 ml	MgCl ₂ , 25 mM	
	200 µl	dNTP Mix, jeweils 10 mM	

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (1000) Qiagen, Hilden Cat. No. 204143

25 ml	2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
	- HotStar Taq DNA Polymerase
	- QuantiTect SYBR Green PCR Buffer
	- dNTP Mix, inkl. dUTP
	- SYBR Green I
	- ROX passive reference dye
	- 5 mM MgCl ₂
20 ml	DNase-freies Wasser

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50) Qiagen, Hilden Cat. No. 74804

50	RNeasy Mini Spin Columns (jedes in einem 2 ml Collection Tube)
50	Collection Tubes (1,5 ml)
50	Collection Tubes (2 ml)
50 ml	QIAzol Lysis Reagent
45 ml	Buffer RW1
11 ml	Buffer RPE (Konzentrat)
10 ml	RNase-freies Wasser

2.2.5 Primer

Alle genspezifischen Primer wurden von der Firma Sigma-Genosys, Steinheim bezogen.

GAPDH	Sence	5' > CTC CTC CAC CTT TGA CGC TG < 3'
	Antisence	5' > ACC ACC CTG TTG CTG TAG CC < 3'

β-ACTIN	Sence	5' > CAT TGC CGA CAG GAT GCA < 3'
	Antisence	5' > CCG ATC CAC ACG GAG TAC < 3'

DBCCR1	Sence	5' > GTC GCC ACA ATC CCA ACC AC < 3'
	Antisence	5' > CCA AAA CCC ATT CTC ATT ACA GTA G < 3'

OLIG2	Sence	5' > CGT CGT CCA CCA AGA AGG AC < 3'
	Antisence	5' > TGT GCC TAC GGC ATG ACC TC < 3'

IL13Rα2	Sence	5' > GGC TGT ACT TCA TCT TCA G < 3'
	Antisence	5' > AAT GAT CCA GAG ACA GTG G < 3'

2.3 Methoden

2.3.1 Theoretische Grundlagen der Methodik

Die relative Quantifizierung der Expression der Zielgene IL13R α 2, OLIG2 und DBCCR1 in den Tumorproben erfolgte mittels Real-Time PCR. Um diese durchführen zu können, waren folgende Einzelschritte notwendig:

Zunächst musste die Gesamt-RNA aus den nativen Gewebeproben isoliert werden. Für die weitere Untersuchung wurde die messenger-RNA (mRNA) in complementary-DNA (cDNA) transkribiert. Hierfür wurde die Methode der reversen Transkription verwendet.

Da es sich bei der Real-Time PCR um eine relativ kostspielige Untersuchung handelt, wurde vor ihrer Durchführung, die Qualität der resultierenden cDNA überprüft. Hierfür wurde eine PCR für das Housekeeping-Gen β -ACTIN mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Bei positiver Bandenbildung für das Housekeeping-Gen wurde die cDNA für die Real-Time PCR verwendet, bei negativem Resultat wurde die reverse Transkription wiederholt. Bei einem abermaligen negativen Ergebnis wurde die jeweilige Probe nicht für die Real-Time PCR eingesetzt.

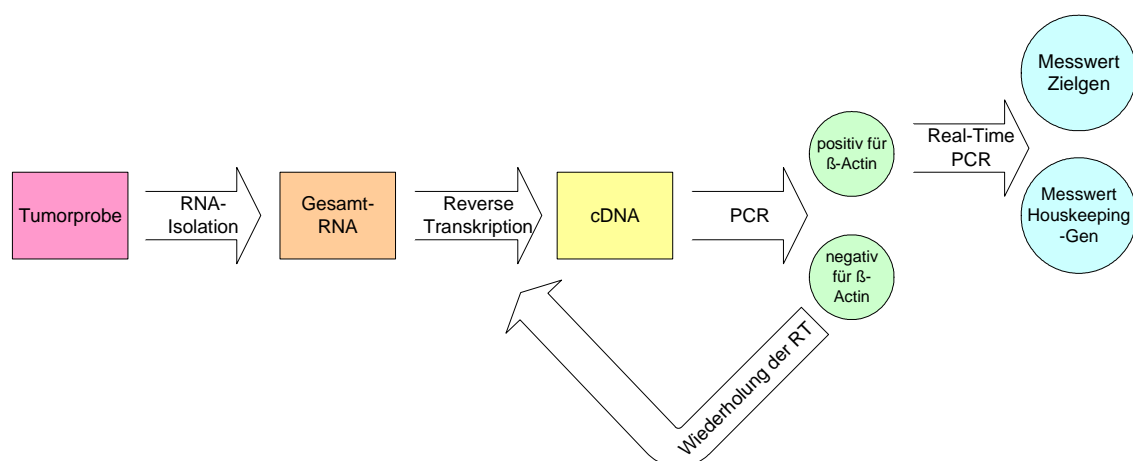


Abbildung 10: Schematische Übersicht über den Versuchsaufbau.

Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen, auf denen die in dieser Arbeit verwendeten Methoden basieren, genauer erläutert.

2.3.1.1 RNA-Isolierung

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur RNA-Isolierung aus Gewebeproben, handelt es sich um eine modifizierte single-step Guanidinisothiocyanat Methode nach *Chomczynski und Sacchi (1987)*. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist der möglichst suffiziente Aufschluss der Gewebestrukturen und Scherung der Zellmembranen. Hierüber wird eine Freisetzung der gesamten zellulären RNA erreicht, die somit für die weiteren Schritte der Isolierung zugänglich ist. Unterstützt wird der Aufschluss der Zellen zusätzlich durch den Einsatz eines Lysierungsreagenz, dass die chemische Zersetzung der Zellmembran bewirkt.

Bei dem Lysierungsreagenz handelt es sich um eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Es wirkt denaturierend auf Proteine und führt so zu einer Inaktivierung endogener RNasen, was eine hohe Ausbeute an intakter gesamt-RNA begünstigt.

Durch Zugabe von Chloroform wird dann innerhalb des Lysats der Dichtegradient verstärkt und eine anschließende Zentrifugation führt zur Separation der Suspension in drei Phasen. Dabei sammelt sich die gelöste RNA in der obersten wässrigen Phase, die daraufhin abpipettiert wird.

Die endgültige Isolierung der RNA findet dann mit Hilfe von Zentrifugationssäulen mit Silicamembranen statt. Ein spezieller Hochsalzpuffer erlaubt die Bindung von bis zu 100 µg RNA mit einer Länge von mehr als 200 Nukleotiden an die Membran. Dieser Umstand hat den Vorteil, dass neben vorhandene Verunreinigungen, wie z.B. Proteinen und Phenol, auch RNA-Spezies mit weniger als 200 Nukleotiden Länge (z.B. 5,8S-rRNA, 5S-rRNA und tRNAs), die zusammen 15 – 20% der Gesamt-RNA ausmachen, über mehrere Waschschrte selektiv entfernt werden. Dies führt zu einer Anreicherung der mRNA, welche dann in einem letzten Schritt mit RNase-freiem Wasser von der Silicamembran elluiert werden kann (*Bonham et al., 1996*).

2.3.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie

Für die weiteren Untersuchungen ist es entscheidend zu wissen, wie viel RNA aus den Gewebeproben isoliert wurde. Dies kann man über die Bestimmung der optischen Dichte (OD) mit Hilfe eines Spektrophotometers ermitteln. Dabei macht man sich zunutze, dass in Wasser gelöste Stoffe beim Durchstrahlen des Wassers Licht absorbieren. Unter definierten Bedingungen ist diese Absorption äquivalent zur Konzentration des jeweiligen Stoffes.

Für die Konzentrationsbestimmung von RNA wird die Absorption in einer Quarzglasküvette mit einem Durchmesser von 10 mm bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. *Sambrook et al. (2001)* definierten einen Umrechnungsfaktor für RNA, demzufolge entspricht ein OD-Wert von 1,0 einer RNA-Konzentration von 40 µg pro ml. Außerdem wurde die Reinheit der RNA durch die Berechnung des Quotienten der OD-Werte bei 260 nm und 280 nm (OD_{260nm}/OD_{280nm}) überprüft. Bei reinen RNA-Lösungen hat dieser Quotient den Wert von 2,0. Ist der Wert deutlich kleiner, weist dies auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen hin.

2.3.1.3 Reverse Transkription

Das Prinzip der reversen Transkription besteht in der Herstellung von complementary-DNA (cDNA) aus messenger-RNA (mRNA). Als Vorbild hierfür dient die, 1970 von Howard Temin und David Baltimore entdeckte Fähigkeit von Retroviren (z.B. HIV, HTLV, SIV) ihre RNA in DNA umzuschreiben und so die Produktion von Viruspartikeln in der Wirtszelle zu ermöglichen.

Das Schlüsselenzym bei diesem Vorgang ist die reverse Transkriptase (RT) oder auch RNA-abhängige DNA-Polymerase, welches als Matrize sowohl RNA-, als auch DNA-Einzelstränge verwenden kann. Als Startpunkt benötigt die RT einen Primer. Hierbei kann es sich um einen genspezifischen oder aber einen random Primer handeln. Ziel dieses Versuchsaufbaus war es, zunächst die gesamte mRNA in cDNA umzuschreiben. Deshalb wurde ein Oligo(dT₁₈)-Primer benutzt, der in der Lage ist, sich an das Poly(A)-Ende der mRNA-

Moleküle anzulagern und somit die Transkription zu triggern (*Lekanne Deprez et al., 2002*).

2.3.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarosegelelektrophorese

Die PCR stellt eine Methode zur gezielten Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten dar. Voraussetzung für ihre Durchführung ist, dass die jeweiligen Zielabschnitte von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden. Zwei zu diesen Sequenzen komplementäre und aus 18 – 30 Basen bestehende Oligonukleotide (Primer) dienen dann als Ausgangspunkt der enzymatischen Synthese eines komplementären DNA-Stranges.

Ein klassischer PCR-Zyklus besteht aus 3 Schritten. Zuerst wird der als Matrize fungierende DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 93°C bis 95°C in Einzelstränge denaturiert. Es folgt die so genannte „Annealing Phase“ bei der die Primer an die jeweils komplementäre Nukleotidsequenz der Matrize binden. Die exakte Annealing-Temperatur ist von der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer abhängig und liegt im Allgemeinen zwischen 50°C und 65°C. Als dritter Schritt folgt im Anschluss die Extensions-Phase, in der mittels einer Polymerase durch Anhängen von Desoxynukleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) an das 3'-Ende der Primer die Synthese einer zur Matrize komplementären DNA-Sequenz erfolgt.

Der oben beschriebene Zyklus wird ca. 25- bis 40-mal wiederholt, wobei die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge in jedem Zyklus erneut als Matrize dienen. Während des ersten Zyklus entsteht noch ein Produkt undefinierter Länge. Ab dem dritten Zyklus entsteht dann aber überwiegend Produkt der durch die Primer vorgegebenen Länge. Theoretisch kommt es somit ab diesem Zeitpunkt zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz. In der Praxis werden aber aus verschiedenen Gründen niedrigere Amplifizierungsraten erreicht.

Kary Banks Mullis veröffentlichte 1984 zum ersten Mal diese Methode zur in-vitro-Amplifizierung von Nukleinsäure-Fragmenten und erhielt dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie (*Mullis, 1990*). Seine ursprüngliche Vorgehensweise war allerdings relativ zeitaufwendig und teuer, da er bakterielle DNA-Polymerase

einsetzte, die bei jedem Denaturierungsschritt bei 90°C inaktiviert wurde und erneut zugesetzt werden musste. Dieses Problem konnte aber mit der Verwendung thermostabiler Polymerasen umgangen werden. Das heute am häufigsten Verwendete Enzym stammt aus dem Organismus *Thermus aquaticus* und wird infolge dessen als Taq-Polymerase bezeichnet. Die besonderen Eigenschaften dieses Enzyms hinsichtlich Temperaturtoleranz ermöglicht den Gebrauch automatisierter Thermocycler für die PCR. Dies führt nicht nur zu einer signifikanten Zeitersparnis, sondern auch zu einer Verminderung von Kontaminationen.

Der Erfolg der PCR lässt mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüfen. Das Polysaccharid Agarose ist ein lineares Polymer aus alternierend 1,3-verknüpften β -D-Galactopyranose-Resten und 1,4-verknüpften 3,6-Anhydro- α -L-Galactopyranose-Resten. Agarose löst sich beim Erhitzen in Wasser und bildet beim Abkühlen ein Gel mit einer netzartigen dreidimensionalen Struktur. Üblicherweise wird die nach dem Erhitzen flüssige Agarose in eine Gelkammer gegossen. Auf der Kathodenseite des Gels wird ein Gelkamm eingesetzt, so dass nach dem Erstarren des Gels und Entfernen des Kammes Taschen zurückbleiben. Nach dem Überschichten des Gels mit Elektrophoresepuffer, werden die zu untersuchenden DNA-Proben in diese Taschen gefüllt. Da die DNA-Lösungen aber eine ähnliche Dichte wie der Elektrophoresepuffer besitzen, müssen sie zuvor mit einem Laufpuffer vermischt werden, der die Dichte erhöht und so zu Absinken der Proben in die Tasche führt. Außerdem ist dem Laufpuffer in der Regel ein Farbstoff zugesetzt, um einen leichteren Verfolgen des Fortschrittes der Elektrophorese zu ermöglichen.

Nach dem Befüllen der Geltaschen wird eine Spannung angelegt (ca. 5 – 10 V/cm Gellänge). Die Phosphatreste der Nukleinsäuren sind bei dem leicht alkalischen pH-Wert des Puffers negativ geladen. Da bei Nukleinsäuren das relative Verhältnis zwischen Phosphatresten und Molekulargewicht und damit die relative Molekülladung konstant bleiben, ist die elektrophoretische Beweglichkeit von DNA-Molekülen durch ein Gelnetz proportional zum Molekulargewicht. Durch Vergleich der Wanderungstrecke einzelner DNA-Fragmente unbekannter Größe mit Fragmenten bekannter Größe, lässt sich die Größe der unbekannten DNA bestimmen.

Der Nachweis von DNA in einem Agarosegel erfolgt am einfachsten durch Ethidiumbromid, einem roten Farbstoff, der zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert und in diesem Zustand sehr stark fluoresziert. Die Fluoreszenzanregung erfolgt durch UV-Licht bei 254 nm. Bei erfolgreicher Elektrophorese lassen sich im Gel einzelne Banden mit DNA-Fragmenten identischer Länge nachweisen.

2.3.1.5 Das Prinzip der Real-Time PCR

Grundlage der Real-Time PCR ist, wie auch bei der zuvor beschriebenen konventionellen PCR, die Amplifikation einer DNA-Sequenz, die von zwei spezifischen Primern eingerahmt wird. Die Besonderheit bei der Real-Time PCR besteht aber darin, dass es möglich ist, während des Verlaufs der PCR kontinuierlich (also in „real-time“) das entstehende PCR-Produkt zu messen. Die Quantifizierung erfolgt während oder am Ende eines PCR-Zyklus über die Messung von Fluoreszenzänderungen.

Im Wesentlichen existieren zwei verschiedene Methoden für die Real-Time PCR. Eine verbreitete Methode, die auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand, basiert auf der Eigenschaft einiger Fluoreszenz-Farbstoffe in Nukleinsäuren zu interkalieren und darauf mit einer Verstärkung der Fluoreszenz zu reagieren. Die Zunahme der Zielsequenz korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Bei dieser Studie wurde der Farbstoff SYBR-Green I verwendet. SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der doppelsträngige DNA bindet. Der daraus resultierende DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 498 nm und emittiert grünes Licht bei 522 nm (*Morrison et al., 1998*).

Die zweite Methode arbeitet mit so genannten FRED-Sonden (FRED = Försters resonance energy transfer) z.B. Hybridisierungs- oder Hydrolyse-Sonden. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotide, welche sich während des PCR-Zyklus zwischen den Primern an die template-DNA anlagern. Grundlage ist die Beobachtung von Förster, dass es zu einem Fluoreszenz-Energietransfer von einem auf einen anderen Fluoreszenz-Farbstoff kommen kann, sobald sich

zwei geeignete Farbstoffe in enger räumlicher Nähe befinden. Ein Zusammenbringen der Farbstoffe führt somit zu einer Zunahme, eine Trennung zu einer Abnahme der Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes (*Förster, 1948*). Indem man die verwendeten Oligonukleotide mit den entsprechenden Farbstoffen markiert, kann man dementsprechend eine Veränderung der Fluoreszenz detektieren, wenn sich zwei Sonden nahe beieinander in den gebildeten DNA-Strang einlagern oder sich die einzelnen Farbstoffe über die Hydrolyse einer mit beiden Farbstoffen markierten Sonde, voneinander entfernen (*Holland et al., 1991; Heid et al., 1996*).

Neben der kontinuierlichen Detektion der Zunahme der Zielsequenz bietet die Real-Time PCR zusätzlich die Möglichkeit nach angeschlossener Amplifikation mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse zwischen dem Zielprodukt und unspezifischer DNA (z.B. Primerdimere) zu differenzieren. In Abhängigkeit der Nukleotidlänge und Zusammensetzung zerfällt jeder DNA-Doppelstrang bei einer für ihn charakteristischen Temperatur, der Schmelztemperatur, in seine zwei Einzelstränge. Dieser Zerfall kann aufgrund der damit einhergehenden Fluoreszenzabnahme gemessen werden. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung anhand der Fluoreszenzabnahme bei kontinuierlicher Zunahme der Temperatur möglich (*Ririe et al., 1997*).

Die praktische Durchführung der Real-Time PCR erfolgt in speziellen Geräten, wie dem in dieser Arbeit verwendeten ABI Sequence Detection System 7700 von der Firma Applied Biosystems, Darmstadt. Hierbei handelt es sich um eine Thermocycler-Einheit, in der zeitgleich 96 Reaktionen auf so genannten 96-Well Reaction Plates untersucht werden können. Entscheidender Bestandteil ist aber die optische Einheit. Sie besteht aus einem Argon-Laser und einer Charge-Coupled Device (CCD) Kamera. Der Laserstrahl wird durch einen dichroiden Spiegel und ein Linsensystem zu einem Multiplexer geleitet, der ihn über Glasfasern nacheinander in die einzelnen Reaktionsgefäße lenkt. Durch den geschlossenen Deckel hindurch werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt. Das Fluoreszenzsignal gelangt auf demselben Weg zurück zum dichroiden

Spiegel, wird von diesem reflektiert, durch ein weiteres Linsensystem geleitet und von einem Spektrograph in sein Spektrum zerlegt. Dieses wird von einer CCD Kamera aufgezeichnet. Über einen angeschlossenen Computer können die ermittelten Daten abgerufen und ausgewertet werden (*Applied Biosystems, ABI Prism SDS 7700 User's Manual*).

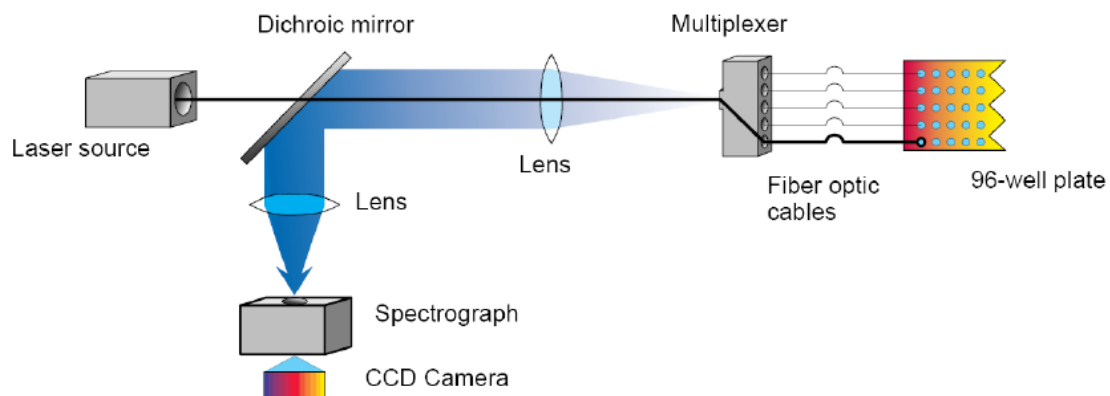


Abbildung 11: Funktionsprinzip des ABI Prism 7700. (*Applied Biosystems, ABI Prism SDS 7700 User's Manual*)

2.3.1.6 Das Prinzip der relativen Quantifizierung

Das Prinzip der relativen Quantifizierung besteht darin, Unterschiede in der Genexpression eines spezifischen Zielgens zwischen verschiedenen Proben zu ermitteln, ohne dabei eine Aussage über die absolute Menge an ursprünglich vorhandener mRNA zu treffen. Hierfür existieren eine Reihe unterschiedlicher Methoden, wobei in dieser Arbeit die delta-delta- C_T Methode ($\Delta\Delta C_T$ Methode) verwendet wurde (*Livak et al., 2001*).

Die delta-delta- C_T Methode ($\Delta\Delta C_T$ Methode) ermöglicht es, die Unterschiede in der Expression eines Zielgens als n-faches der Expression des Zielgens in einer Kalibrator-Probe anzugeben. Die Grundlage für die Berechnung der relativen Expression bildet dabei der C_T -Wert (C_T = Threshold Cycle), der mit Hilfe des ABI Sequence Detection System 7700 ermittelt wurde. Der C_T -Wert beschreibt den PCR- Zyklus, an dem die gemessene Fluoreszenz erstmalig

signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Er markiert somit den Anfang des exponentiellen und daher quantifizierbaren Anstiegs des PCR-Produktes (Higuchi et al., 1993).

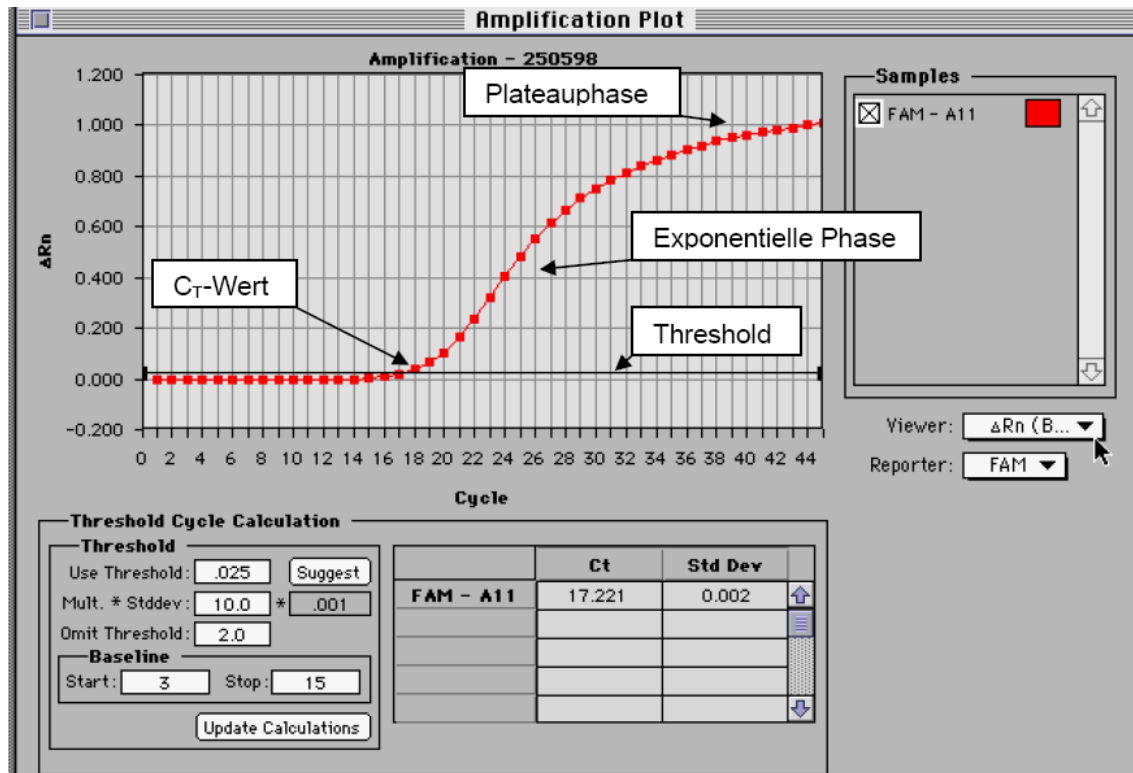


Abbildung 12: Beispiel für den Anstieg der gemessenen Fluoreszenz während einer Real-Time PCR. (Screenshot)

Essentiell für die relative Quantifizierung ist, dass neben dem Zielgen auch ein geeignetes endogenes Referenzgen untersucht wird. Dabei fungiert das endogene Referenzgen als probeneigener Kalibrator, der es ermöglicht, Unterschiede in der eingesetzten Menge cDNA zwischen den einzelnen Proben zu nivellieren. Theoretisch ist jedes Gen, das in den untersuchten Proben gleich stark exprimiert wird, als endogenes Referenzgen geeignet. Häufig wird aber, wie auch in dieser Arbeit, auf so genannte Housekeeping-Gene zurückgegriffen. Hierbei handelt es sich um Gene, die für den Erhalt der Zellfunktion notwendig sind, da sie für Strukturmoleküle oder Enzyme des Intermediärstoffwechsels codieren, und deshalb konsekutiv exprimiert werden.

Entscheidend bei der Auswahl eines endogenen Referenzgens ist, dass die Effizienz der PCR für dieses Gen ähnlich der des Zielgens ist. Die Effizienz stellt dabei die Rate dar, mit der die Amplifikation des PCR-Produktes stattfindet. Sie wird in der Regel als prozentualer Wert angegeben, wobei die Effizienz einer PCR 100% beträgt, wenn sich während der exponentiellen Phase die Anzahl der Amplifikate verdoppelt. Die Effizienz (E) kann mit Hilfe der Steigung (m) einer Standardkurve berechnet werden. Eine Standardkurve wird graphisch erstellt, indem der dekadische Logarithmus des C_T -Wertes gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Nukleinsäure-Konzentration aufgetragen und eine Ausgleichsgerade über die Punkte gelegt wird. Die Steigung der Ausgleichsgeraden entspricht der benötigten Steigung (m). Die Formel für die Effizienz lautet:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Eine Steigung (m) von -3.32 würde somit eine Effizienz (E) von 100 % bedeuten, d.h. eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus.

Üblicherweise wird für die Ermittlung eines endogenen Referenzgens die cDNA einer Probe untersucht, die sowohl das Zielgen, als auch das potentielle Referenzgen ähnlich stark exprimieren. Es wird eine Verdünnungsreihe mit abnehmenden cDNA-Konzentrationen erstellt und anschließend für jede Verdünnungsstufe experimentell der C_T -Werte für beide Gene bestimmt. Dann kann analog zu der oben beschriebenen Methode die PCR-Effizienz für beide Gene ermittelt werden. Sie sollte in keinem Fall unter 85% liegen. Sofern dies zutrifft, wird im nächsten Schritt ermittelt, ob die Effizienzen im ausreichenden Maße übereinstimmen. Dafür wird die Differenz der C_T -Werte für die PCR des Zielgens und des potentiellen Referenzgens für jeden Verdünnungsschritt berechnet.

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

Die so bestimmten ΔC_T -Werte werden in einem Koordinatensystem gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen cDNA-Verdünnung aufgetragen. Über die Punkte wird dann eine Ausgleichsgerade gelegt. Damit die Bedingungen für den Gebrauch des endogenen Referenzgens erfüllt sind, muss die Steigung dieser Geraden unter 0,1 liegen. Im optimalen Falle wäre sie Null, diese würde einer Übereinstimmung hinsichtlich der Effizienz der PCR für beide Gene von 100 % entsprechen.

Zum Abschluss muss eine Kalibrator-Probe festgelegt werden. Die Expression des Zielgens kann dann als n-faches der Expression des Zielgens in dieser Probe angegeben werden. Um den Faktor n berechnen zu können, wird für die Kalibrator-Probe, sowie die zu untersuchenden Proben der C_T -Wert für Ziel- und endogenes Referenzgen experimentell ermittelt. Es folgt die Berechnung des ΔC_T -Wertes für alle Proben.

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

Danach wird der $\Delta\Delta C_T$ -Wert bestimmt. Dieser entspricht der Differenz des ΔC_T -Wertes der zu untersuchenden Probe und der Kalibrator-Probe.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kalibrator-Probe}$$

Um nun die Expression des Zielgens als n-faches relativ zur Kalibrator-Probe angeben zu können, wird der Faktor n mit folgender Formel berechnet:

$$n = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Hat n den Wert 2, so bedeutet dies, dass in der untersuchten Probe das Zielgen doppelt so hoch exprimiert ist, wie in der Kalibrator-Probe. Wenn $n = 0,5$ ist, so ist die Expression des Zielgens nur halb so hoch, wie in der Kalibrator-Probe (*Applied Biosystems, 2001; Lival et al., 2001*).

2.3.1.7 Primerdesign

Für eine erfolgreiche PCR mit maximaler Spezifität und Effizienz ist ein optimales Primerdesign essentiell. Hierbei sind einige Punkte zu beachten (nach Qiagen, 2006):

1. Das 3'-Ende der Oligonukleotide ist für die spezifische Anlagerung des Primers an seine Zielsequenz im DNA-Strang am entscheidendsten. Hier sollten sich die Nucleoside Guanosin (G) und Cytidin (C) nicht mehr als zweimal wiederholen. Ebenso sollte am 3'-Ende kein Thymidin (T) stehen.
2. Die Primersequenz darf keine komplementären Abschnitte besitzen, da es andernfalls zur Ausbildung von Haarnadel-Strukturen kommen kann. Gleiches gilt für die Nukleotidsequenz der Primer-Paare, da es sonst zur Bildung von Primer-Dimeren kommt.
3. Die Länge des Primers sollte zwischen 18 bis 30 Nucleosiden liegen. Theoretisch ist davon auszugehen, dass ein Primer mit 18 Basen spezifisch an nur eine einzige Sequenz innerhalb der DNA binden sollte, da er rechnerisch eine von $4^{18} = 7 \times 10^{10}$ möglichen Sequenzen repräsentiert.
4. Der Anteil an Guanosin (G) und Cytidin (C) sollte bei 40 – 60% liegen.
5. Es sollte auf ähnliche Schmelztemperaturen (T_m) der eingesetzten Primer geachtet werden. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgt dabei nach folgender Formel:

$$T_m (^\circ\text{C}) = 2^\circ\text{C} (N_A + N_T) + 4^\circ\text{C} (N_G + N_C)$$

N= Anzahl der in den Primern enthaltenen Basen Adenin (A),
Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin

Unter Berücksichtigung dieser Punkte wurden die Nukleotidsequenzen der Zielgene untersucht und die Sequenz eines entsprechenden Primer-Paares erstellt. Die Primer wurden dann von der Firma Sigma Genosys nach diesen Vorgaben produziert.

Die Sequenzen der Zielgene wurden über die Datenbank des National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) abgerufen.

2.3.2 Die praktische Durchführung

2.3.2.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Ribonukleinsäure aus den Tumorseiten erfolgte unter Zuhilfenahme des RNeasy® Lipid Tissue Mini Kits der Firma Qiagen™, Hilden nach dem Protokoll des Herstellers und mit gesonderten RNase-freien Materialien und Lösungen.

Am Anfang der RNA-Isolierung steht eine suffiziente Lyse und Homogenisierung der Gewebeparten zur Freisetzung der Gesamt-RNA. Hierfür wurden 80 – 100 mg des tiefgefrorenen Tumorgewebes zusammen mit 1 ml QIAzol®-Lysis Reagenz in einen Mikromörser gegeben und dort bis zum Aufschluss der Gewebestrukturen zerkleinert. Um eine möglichst vollständige Scherung der Zelle zu erreichen, wurde die entstandene Suspension so lange über eine 20-Gauge-Kanüle in eine Einmalspritze aufgezogen, bis ein homogenes Lysat vorlag. Anschließend wurde das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 2 - 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch die Zugabe von 200 µl Chloroform zur Verstärkung des Dichtgradienten innerhalb des Lysats und anschließender Zentrifugation (4°C, 12000 rpm, 20min.), erfolgte die Separation der Suspension in 3 Phasen: Die obere, wässrige Phase

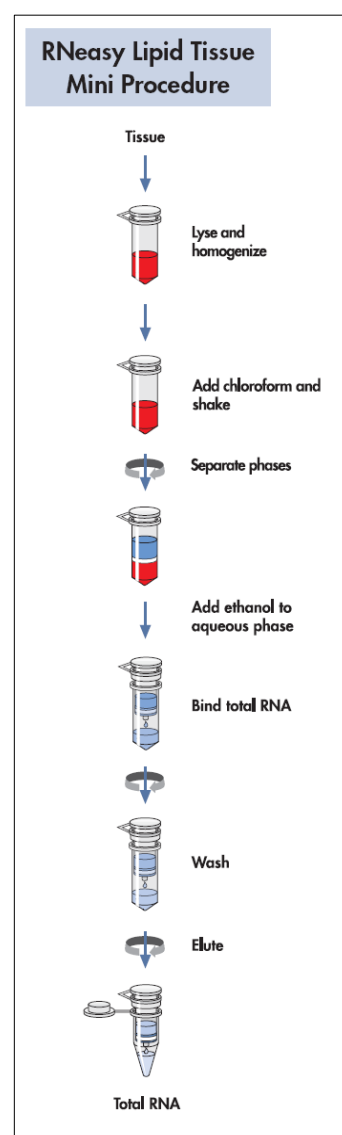


Abbildung 13: Schematischer Ablauf der RNA-Isolation. (Qiagen RNeasy Lipid Tissue Handbuch)

enthielt die gelöste RNA, die Interphase größere DNA-Fragmente und in der untere organische Phase sammelten sich Proteine und kleinere DNA-Fragmente.

Zur weiteren Bearbeitung wurden die wässrige Phase abpipettiert und durch Zugabe von Ethanol 70% im Verhältnis 1:1 (ca. 600 µl) wurden die entsprechenden Bindungsbedingungen für den Auftrag der Suspension auf eine Zentrifugationssäule mit Silicamembran hergestellt.

Im Einzelnen wurde die Silicamembran nach Durchlauf der Probe einmal mit 700 µl des im Kit enthaltenen RW1-Puffers und zweimal mit je 500 µl des RPE-Puffers gewaschen. Vor dem Elluieren der RNA wurde die Säule 1 Minute mit voller Geschwindigkeit (14000 rpm) zentrifugiert, um eventuell verbliebene Rückstände der Puffer vollständig zu entfernen.

Daraufhin wurde die RNA durch zweimaliges Waschen der Silicamembran mit jeweils 30 µl RNase-freien Wassers elluiert. Von den so gewonnen 60 µl Elluat wurden 10 µl zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration genutzt. Die restliche Probe wurde mit Ethanol, absolut im Verhältnis 1:1 (50 µl) gefällt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung mittels

Absorptionsspektrometrie

Die Bestimmung der RNA-Konzentration in dem gewonnenen Elluat erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Spektrophotometer (GeneQuant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Freiburg). Nach entsprechender Verdünnung der 10 µl Probe mit 190 µl RNase-freien Wassers, wurde die Extinktion in einer Quarzglasküvette mit einem Durchmesser von 10 mm bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des (OD_{260nm}/OD_{280nm})-Quotienten.

Je Probe wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Für das weitere Verfahren wurde der Mittelwert aus beiden Messungen genutzt.

2.3.2.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der mRNA in cDNA erfolgte unter Zuhilfenahme des Omniscript RT Kits der Firma Qiagen, Hilden nach dem Protokoll des Herstellers und mit gesonderten RNase-freien Materialien und Lösungen.

Vor der weiteren Verarbeitung der Proben musste die gefällte RNA jedoch wieder entfällt werden. Dazu wurde die tiefgefrorene Probe aufgetaut und anschließend bei 4°C und 14000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Nach dieser Zeit hatte sich die in der Probe enthaltene RNA am Boden des Eppendorfgefäßes gesammelt. Der Überstand wurde abpipettiert und 500 µl Ethanol 70% zur Probe gegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation (4°C, 14000 rpm, 15 min.) bei der sich die RNA in Form eines Pellets am Boden des Eppendorfgefäßes sammelte. Wieder wurde der Überstand abpipettiert und das Reaktionsgefäß zur Eintrocknung des Pellets in eine Speed-Vac-Zentrifuge gestellt.

Im nächsten Schritt wurde das RNA-Pellet mit RNase-freiem Wasser wieder gelöst. Hierbei wurde unter Berücksichtigung der aus der OD-Messung bekannten Menge an RNA (abzüglich 10% Verlust während der Entfällung) soviel Wasser hinzugefügt, dass sich eine RNA-Konzentration von 1 µg RNA pro 5 µl Wasser ergab. Für die reverse Transkription wurden 4 µg RNA (20 µl der Lösung) in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt, die restliche Probe wurde im Verhältnis 1:1 mit Ethanol, absolut gefällt und bei -80°C gelagert.

Um mit der reversen Transkription fortzufahren, wurde ein Master-Mix aus den im Kit enthaltenen Reagenzien gemischt. Pro Probe wurden eingesetzt:

RT Master-Mix (je Probe):	2 µl	Omniscript Reverse Transcriptase
	4 µl	Oligo(dT ₁₈)-Primer, 10 µM
	4 µl	Buffer RT, 10x
	4 µl	dNTP Mix, jeweils 5 mM
	6 µl	RNase-freies Wasser

Je 20 µl RT Master-Mix wurden zu den 20 µl Probe pipettiert, so dass ein Reaktionsvolumen von 40 µl entstand. Dieses wurde bei 37°C für 60 Minuten im Thermocycler inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2.4 cDNA-Qualitätskontrolle

Für die Durchführung der PCR wurde der Taq PCR Core Kit der Firma Qiagen, Hilden und der PTC-200 Gradient Cycler der Firma MJ Research verwendet. Es wurde nach einem Standardprotokoll und mit gesonderten DNase-freien Materialien gearbeitet.

Zu Beginn wurde ein Master-Mix aus den im Kit enthaltenen Reagenzien, sowie den β -ACTIN Primern erstellt.

PCR Master-Mix (je Probe):	0,2 µl	Taq DNA Polymerase
	1,0 µl	dNTP Mix, jeweils 10 mM
	1,0 µl	β -ACTIN Primer sense, 10 µM
	1,0 µl	β -ACTIN Primer antisense, 10 µM
	2,5 µl	Qiagen PCR Buffer, 10x
	18,3 µl	DEPC-Wasser

Je 24 µl PCR Master-Mix wurden zusammen mit 1,0 µl der zuvor synthetisierten cDNA in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, so dass ein Reaktionsvolumen von 25 µl entstand. Die Reaktionsgefäße wurden in den PTC-200 Gradient Cycler gestellt und das unten stehende PCR-Programm gestartet.

Initiale Denaturierung	94°C	150 sec.	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	30 sec.	30 Zyklen
Annealing	55°C	30 sec.	
Extension	72°C	60 sec.	
Abschließende Extension	72°C	600 sec.	1 Zyklus
Holding	20°C		

Tabelle 5: PCR-Programm für die cDNA-Qualitätskontrolle

2.3.2.5 Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Die Probenauftrennung zum Nachweis des zuvor amplifizierten PCR-Produkts erfolgte mittels einer Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel. Dazu wurden in einer Mikrowelle 2 g Agarose mit 100 ml 1xTAE-Puffer erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde die Lösung mit 10 µl Ethidiumbromid 1% versetzt, in eine Elektrophoresekammer gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 1xTAE-Puffer überschichtet. 15 µl des PCR-Produktes wurden mit 3 µl Loading-Buffer gemischt und in die Probentaschen pipettiert. Daraufhin erfolgte die Auftrennung bei einer Spannung von 100 Volt für 45 Minuten. Danach wurde das Gel auf einen UV-Durchleuchtungstisch gelegt und abfotografiert.

2.3.3 Relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR

2.3.3.1 Etablierung der Standardkurven

Um für die drei Zielgene DBCCR1, OLIG2 und IL13Rα2 die jeweils geeigneten endogenen Referenzgene festlegen zu können, wurden, wie oben beschrieben, Standardkurven etabliert. Als potentielle Referenzgene wurden die Housekeeping-Gene GAPDH und β -ACTIN evaluiert. Für die Untersuchung wurde die cDNA einer Probe eines primären Glioblastoms genutzt, für die sich

in Voruntersuchungen mittels konventioneller PCR gezeigt hatte, dass sie alle zu untersuchenden Gene ähnlich stark exprimiert. Die Bestimmung erfolgte unter Zuhilfenahme des QuantiTect SYBR Green PCR Kits der Firma Qiagen, Hilden mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System der Firma Applied Biosystems, Darmstadt auf 96-well Reaktionsplatten.

Zu Beginn wurde mit der cDNA eine Verdünnungsreihe mit folgenden acht Verdünnungsschritten erstellt: 1 ; 1:5 ; 1:10 ; 1:50 ; 1:100 ; 1:200 ; 1:400 ; 1:500. Zur Bestimmung der Effizienz der PCR für das Zielgen, sowie GAPDH und β -ACTIN wurde dann für jeden Verdünnungsschritt und jedes der drei Gene eine Real-Time PCR in dreifacher Ausführung durchgeführt. Hierfür wurde für jedes Gen ein Master-Mix mit den jeweils genspezifischen Primern angesetzt.

Je Well auf der Reaktionsplatte:	12,5 μ l	2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
	10,0 μ l	DNase-freies Wasser
	0,75 μ l	Primer (Sense)
	0,75 μ l	Primer (Antisense)

Anschließend wurden nach dem unten stehenden Schema jeweils 1 μ l des entsprechenden cDNA-Verdünnungsschritt und 24 μ l des genspezifischen Master-Mixes in die Wells der Reaktionsplatte pipettiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 β-ACTIN	1 β-ACTIN	1 β-ACTIN	1:5 β-ACTIN	1:5 β-ACTIN	1:5 β-ACTIN	1:10 β-ACTIN	1:10 B- ACTIN	1:10 β-ACTIN	1:50 β-ACTIN	1:50 β-ACTIN	1:50 β-ACTIN
B	1:100 β-ACTIN	1:100 β-ACTIN	1:100 β-ACTIN	1:200 β-ACTIN	1:200 β-ACTIN	1:200 β-ACTIN	1:400 β-ACTIN	1:400 B- ACTIN	1:400 β-ACTIN	1:500 β-ACTIN	1:500 β-ACTIN	1:500 β-ACTIN
C	NTC β-ACTIN	NTC β-ACTIN	NTC β-ACTIN	1 GAPDH	1 GAPDH	1 GAPDH	1:5 GAPDH	1:5 GAPDH	1:5 GAPDH	1:10 GAPDH	1:10 GAPDH	1:10 GAPDH
D	1:50 GAPDH	1:50 GAPDH	1:50 GAPDH	1:100 GAPDH	1:100 GAPDH	1:100 GAPDH	1:200 GAPDH	1:200 GAPDH	1:200 GAPDH	1:400 GAPDH	1:400 GAPDH	1:400 GAPDH
E	1:500 GAPDH	1:500 GAPDH	1:500 GAPDH	NTC GAPDH	NTC GAPDH	NTC GAPDH	1 DBCCR 1	1 DBCCR 1	1 DBCCR 1	1:5 DBCCR 1	1:5 DBCCR 1	1:5 DBCCR 1
F	1:10 DBCCR 1	1:10 DBCCR 1	1:10 DBCCR 1	1:50 DBCCR 1	1:50 DBCCR 1	1:50 DBCCR 1	1:100 DBCCR 1	1:100 DBCCR 1	1:100 DBCCR 1	1:200 DBCCR 1	1:200 DBCCR 1	1:200 DBCCR 1
G	1:400 DBCCR 1	1:400 DBCCR 1	1:400 DBCCR 1	1:500 DBCCR 1	1:500 DBCCR 1	1:500 DBCCR 1	NTC DBCCR 1	NTC DBCCR 1	NTC DBCCR 1			
H												

Abbildung 14: Beispiel für das Plattenlayout zur Festlegung der endogenen Referenz für das Gen DBCCR1.

Die Proben in den Wells der Reaktionsplatte wurden dann in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor herunterzentrifugiert und die Platte anschließend in den ABI PRISM 7700 gestellt. Die Real-Time PCR erfolgte nach folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	15 min.	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	15 sec.	45 Zyklen
Annealing	genspezifische Temperatur	30 sec.	
Extension	72°C	30 sec.	
Holding	20°C		

Tabelle 6: Programm für die Real-Time PCR

Nach Beendigung der PCR erfolgte die Schmelzkurvenanalyse, um sicherzustellen, dass es ausschließlich zu einer Amplifikation der gewünschten Zielsequenz und nicht zur Bildung von Primer-Dimeren oder anderen unspezifischen Produkten gekommen war. Hierfür wurden die Proben zunächst auf die genspezifische Annealing-Temperatur erhitzt, um zu gewährleisten, dass das gebildete Produkt möglichst vollständig als Doppelstrang vorlag. Dann

wurde über einen Zeitraum von 19:59 min. die Temperatur auf 95°C angehoben und dabei die Fluoreszenz mit Hilfe des Real-Time Zyklers kontinuierlich gemessen.

Aus den drei gewonnenen C_T -Werten pro Verdünnungsschritt und Gen wurde dann der Mittelwert berechnet und dieser zur Bestimmung der Effizienz der PCR für die einzelnen Gene analog zu der weiter oben beschriebenen Methode verwendet. Dazu wurde durch das Auftragen des dekadischen Logarithmus der gemittelten C_T -Werte gegen den dekadischen Logarithmus der cDNA-Konzentration und das anschließende Konstruieren einer Ausgleichsgeraden über diese Punkte, die Steigung m bestimmt. Diese musste für das Zielgen und mindestens eines der Housekeeping-Gene zwischen -3,32 und -3,74 liegen, wobei dies einer Effizienz von 100 % bis 85 % entspricht. Nur wenn diese Voraussetzung erfüllt wurde, erfolgte die Berechnung der Differenz der C_T -Werte (ΔC_T -Wert) für das Zielgen und das Housekeeping-Gen bzw. die Housekeeping-Gene. Der ΔC_T -Wert wurde dann in einem Koordinatensystem gegen den dekadischen Logarithmus der cDNA-Konzentration aufgetragen und eine Ausgleichsgerade über die Punkte gelegt. Lag die Steigung der Ausgleichsgerade unter 0,1, eignete sich das entsprechende Housekeeping-Gen als endogenes Referenzgen.

2.3.3.2 Messung der Proben

Für die Analyse der Expression der Zielgene in den einzelnen Proben, wurde jeweils der C_T -Wert für die PCR des Zielgenes und des zuvor ermittelten endogenen Referenzgens auf ein und derselben Reaktionsplatte gemessen. Für jede Probe wurde dabei eine Dreifachbestimmung für beide Gene durchgeführt. Ein Beispiel eines Platten-Layouts ist unten aufgeführt. Der verwendete Master-Mix wurde, wie auch bei der Etablierung der Standardkurven angesetzt.

Je Well auf der Reaktionsplatte:	12,5 µl	2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
	10,0 µl	DNase-freies Wasser
	0,75 µl	Primer (Sence)
	0,75 µl	Primer (Antisence)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	67/02 β-ACTIN	67/02 β-ACTIN	67/02 β-ACTIN	08/04 β-ACTIN	08/04 β-ACTIN	08/04 β-ACTIN	58/04 β-ACTIN	58/04 β-ACTIN	58/04 β-ACTIN	11/05 β-ACTIN	11/05 β-ACTIN	11/05 β-ACTIN
B	18/05 β-ACTIN	18/05 β-ACTIN	18/05 β-ACTIN	45/06 β-ACTIN	45/06 β-ACTIN	45/06 β-ACTIN	63/02 β-ACTIN	63/02 β-ACTIN	63/02 β-ACTIN	21/03 β-ACTIN	21/03 β-ACTIN	21/03 β-ACTIN
C	37/03 β-ACTIN	37/03 β-ACTIN	37/03 β-ACTIN	65/03 β-ACTIN	65/03 β-ACTIN	65/03 β-ACTIN	75/03 β-ACTIN	75/03 β-ACTIN	75/03 β-ACTIN	96/03 β-ACTIN	96/03 β-ACTIN	96/03 β-ACTIN
D	121/03 β-ACTIN	121/03 β-ACTIN	121/03 β-ACTIN	137/03 β-ACTIN	137/03 β-ACTIN	137/03 β-ACTIN	87/04 β-ACTIN	87/04 β-ACTIN	87/04 β-ACTIN	NTC β-ACTIN	NTC β-ACTIN	NTC β-ACTIN
E	67/02 DBCCR 1	67/02 DBCCR 1	67/02 DBCCR 1	08/04 DBCCR 1	08/04 DBCCR 1	08/04 DBCCR 1	58/04 DBCCR 1	58/04 DBCCR 1	58/04 DBCCR 1	11/05 DBCCR 1	11/05 DBCCR 1	11/05 DBCCR 1
F	18/05 DBCCR 1	18/05 DBCCR 1	18/05 DBCCR 1	45/06 DBCCR 1	45/06 DBCCR 1	45/06 DBCCR 1	63/02 DBCCR 1	63/02 DBCCR 1	63/02 DBCCR 1	21/03 DBCCR 1	21/03 DBCCR 1	21/03 DBCCR 1
G	37/03 DBCCR 1	37/03 DBCCR 1	37/03 DBCCR 1	65/03 DBCCR 1	65/03 DBCCR 1	65/03 DBCCR 1	75/03 DBCCR 1	75/03 DBCCR 1	75/03 DBCCR 1	96/03 DBCCR 1	96/03 DBCCR 1	96/03 DBCCR 1
H	121/03 DBCCR 1	121/03 DBCCR 1	121/03 DBCCR 1	137/03 DBCCR 1	137/03 DBCCR 1	137/03 DBCCR 1	87/04 DBCCR 1	87/04 DBCCR 1	87/04 DBCCR 1	NTC DBCCR 1	NTC DBCCR 1	NTC DBCCR 1

Abbildung 15: Beispiel für das Plattenlayout für die Probemessung für das Gen DBCCR1.

Das verwendete Programm für die Real-Time PCR entsprach ebenfalls demjenigen, das bei der Etablierung der Standardkurven genutzt wurde.

Initiale Denaturierung	95°C	15 min.	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	15 sec.	45 Zyklen
Annealing	genspezifische Temperatur	30 sec.	
Extension	72°C	30 sec.	
Holding	20°C		

Tabelle 7: Programm für die Real-Time PCR

Auch hier erfolgte im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse, um sicherzustellen, dass nur das gewünschte Zielprodukt entstanden war.

2.3.4 Statistische Methoden

Die Untersuchung der Expressionsunterschiede für die Zielgene zwischen den einzelnen Tumorgraden auf statistische Signifikanz erfolgte mit Hilfe des T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen, sobald die Irrtumswahrscheinlichkeit (t) unter 0,05 lag.

Für die Auswertung wurde das Statistikprogrammpaket SPSS Version 14.0 der Firma SPSS Inc., Chicago, USA und das Programm Microsoft Office Excel 2003 der Firma Microsoft Corporation, Redmond, USA verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 RNA-Isolierung und RNA-Konzentrationsbestimmung

Insgesamt wurde nach dem unter Material und Methoden genannten Vorgehen die RNA aus 55 kryokonservierte Tumorproben isoliert. Die RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Absorbtionsspektrometrie und die anschließende Berechnung der absoluten Menge an isolierter RNA ergaben Werte von 1,5 µg bis 109,2 µg, wobei die mittlere Ausbeute bei 21,3 µg lag. Die probenbezogenen Werte sind dem Tabellenanhang zu entnehmen.

Da zwei Proben mit 1,5 µg bzw. 1,9 µg isolierter RNA die für die Fortführung der Versuche notwendige Mindestmenge von 4,0 µg deutlich unterschritten, wurden diese nicht bei den weiteren Messungen berücksichtigt. Die verbliebenen 53 Proben wurden, wie beschrieben, weiter untersucht.

3.2 Reverse Transkription und cDNA-Qualitätskontrolle

Nach Durchführung der reversen Transkription wurde die entstandene cDNA auf ihre Qualität überprüft. Dazu wurde mit dem Transkript der verbliebenen 53 Proben eine Polymerasekettenreaktion für das Housekeeping-Gen β -ACTIN durchgeführt. Das resultierende Produkt wurde dann mittels Flachbettgelelektrophorese auf das Vorliegen des Amplifikates untersucht.

Primär ließen sich bei 49 Proben deutliche Banden, entsprechend der Größe des cDNA-Fragmentes für β -ACTIN nachweisen. Bei den vier negativen bzw. nicht eindeutigen Proben wurde, dem Versuchsprotokoll entsprechend, eine weitere reverse Transkription durchgeführt. Bei der erneuten Überprüfung konnte dann bei zwei Proben ein positives und bei den anderen beiden ein negatives Ergebnis beobachtet werden, so dass insgesamt 51 Proben mit Hilfe der Real-Time-PCR auf die Expression der drei Zielgene untersucht werden konnten.

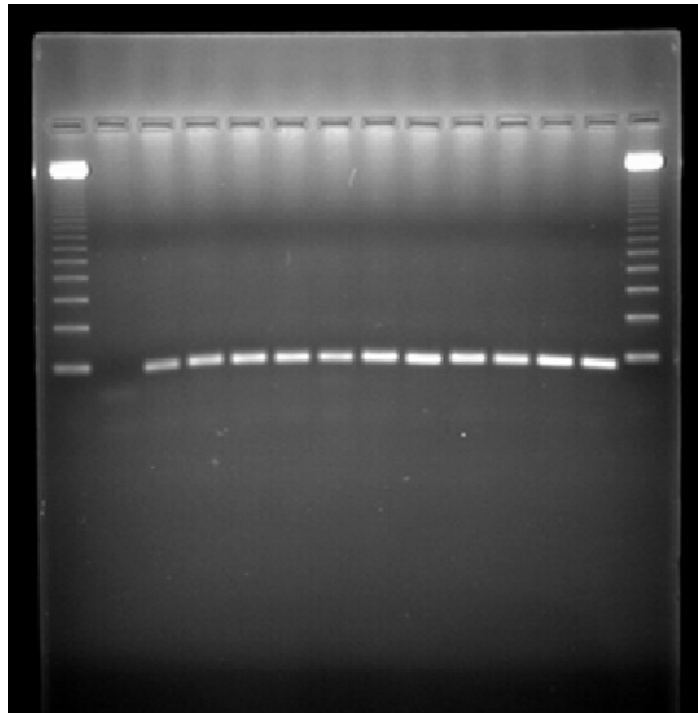


Abbildung 16: Beispielhaftes Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese. In den beiden Bahnen am Rand ist jeweils der Marker zu sehen. In der 2. Bahn von links ist die Negativ- und in der 3. die Positiv-Probe gelaufen. Die übrigen Bahnen zeigen einen erfolgreichen Nachweis für β -ACTIN in den untersuchten Proben.

3.3 Etablierung der Standardkurven

Die Ergebnisse der Überprüfung der PCR-Effizienz für die drei Zielgene, sowie die Ermittlung des passenden endogenen Referenzgens für das jeweilige Zielgen, sind im Folgenden dargestellt.

3.3.1 Standardkurve IL13Rα2

Für das Zielgen IL13Rα2 wurde β-ACTIN als geeignetes endogenes Referenzgen ermittelt. Für beide Gene lag die PCR-Effizienz im geforderten Bereich zwischen 85 – 100 %. Im Einzelnen lag die PCR-Effizienz in dieser Messung für IL13Rα2 bei ca. 96,3 % und für β-ACTIN bei ca. 93,5 %.

Auch die zweite Bedingung, wonach die Ausgleichsgerade über die gegeneinander aufgetragenen DNA-Konzentrationen und ΔCT-Werte eine Steigung von 0,1 nicht übertreffen sollte, wurde erfüllt. Die Steigung betrug 0,074.

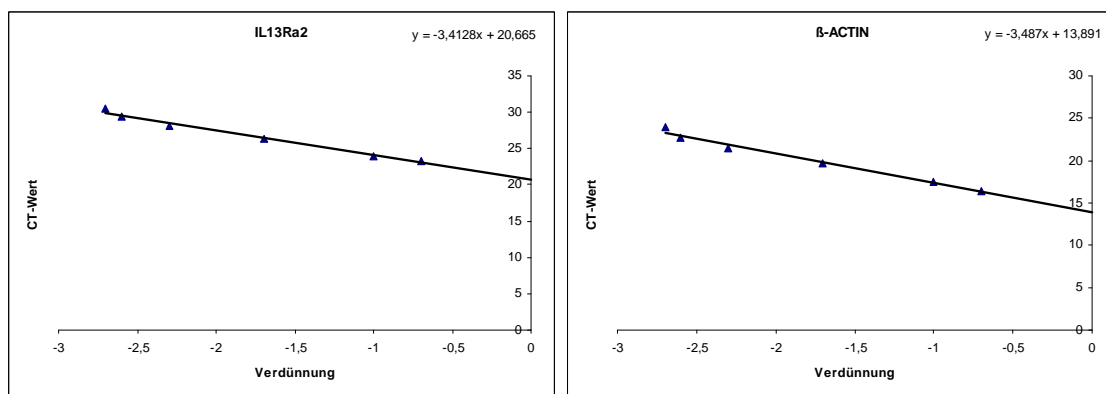
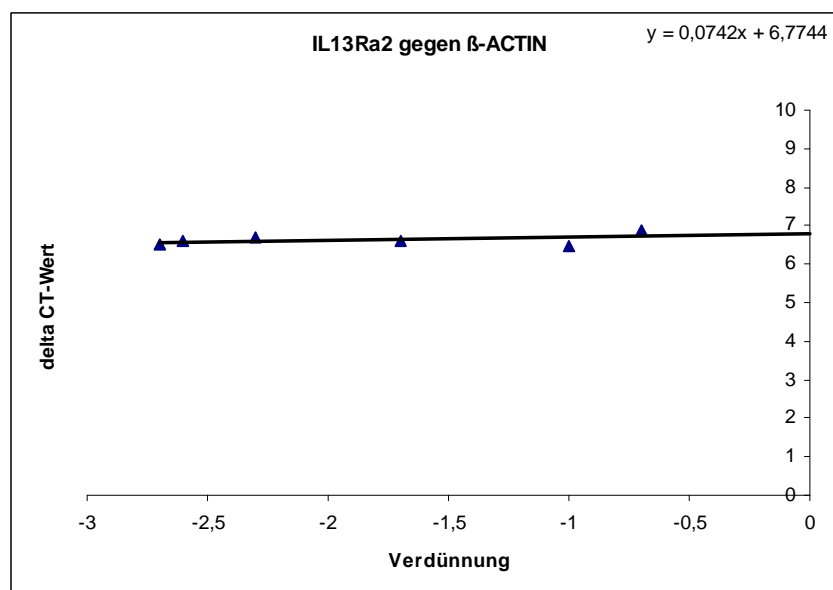


Abbildung 17: Grafische Darstellung der Effizienz-Testung der PCR für IL13Rα2 (oben links) und β-ACTIN (oben rechts), sowie die Darstellung der Korrelation beider PCR-Effizienzen miteinander (unten).



3.3.2 Standardkurve OLIG2

Für OLIG2 konnte GAPDH als geeignete endogene Referenz ermittelt werden. Die Testung der PCR-Effizienz ergab für OLIG2 einen Wert von ca. 90,5 % und für GAPDH von ca. 92,9 %. Mit einer Steigung (m) von -0,057 wurde auch die zweite Bedingung erfüllt.

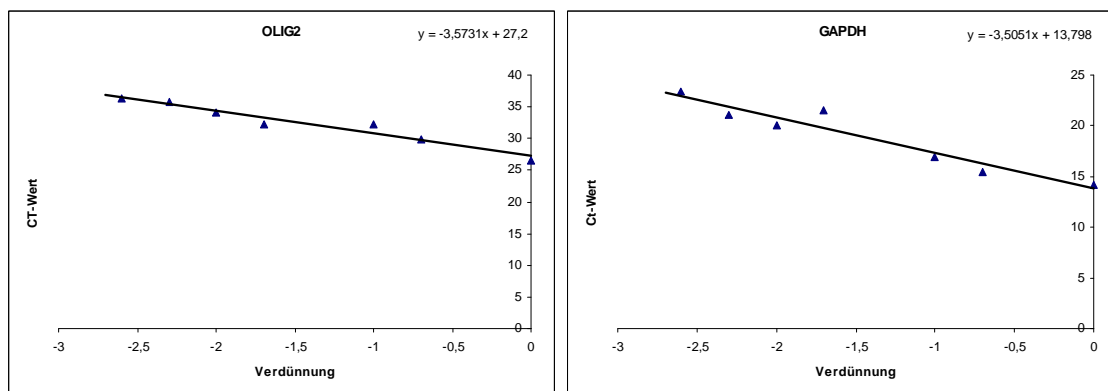
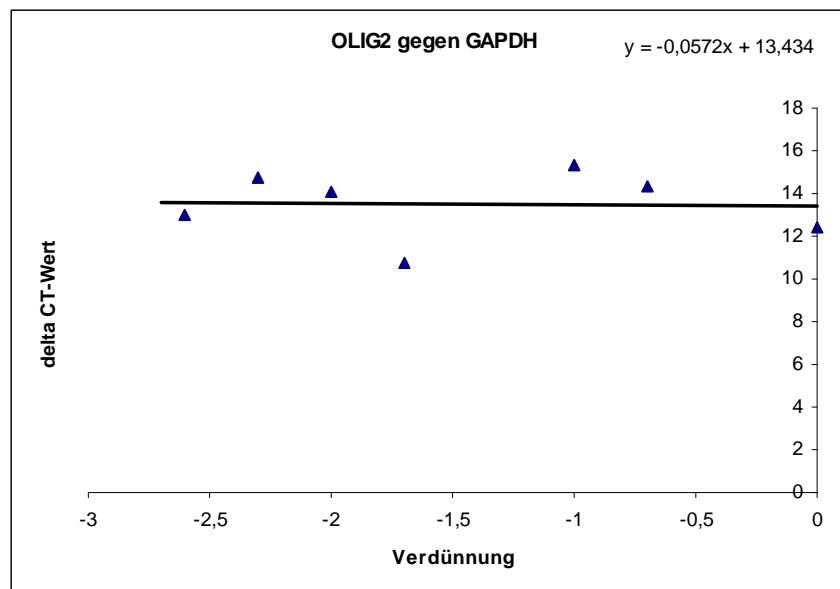


Abbildung 18: Grafische Darstellung der Effizienz-Testung der PCR für OLIG2 (oben links) und GAPDH (oben rechts), sowie die Darstellung der Korrelation beider PCR-Effizienzen miteinander (unten).



3.3.1 Standardkurve DBCCR1

Für DBCCR1 erfüllte wiederum β -ACTIN besser die Bedingungen für das endogene Referenzgen. Die PCR-Effizienz lag bei dieser Messung für DBCCR1 bei ca. 90,0 % und für β -ACTIN bei ca. 94,4 %. Die Steigung (m) der Ausgleichsgeraden lag in diesem Fall bei -0,036.

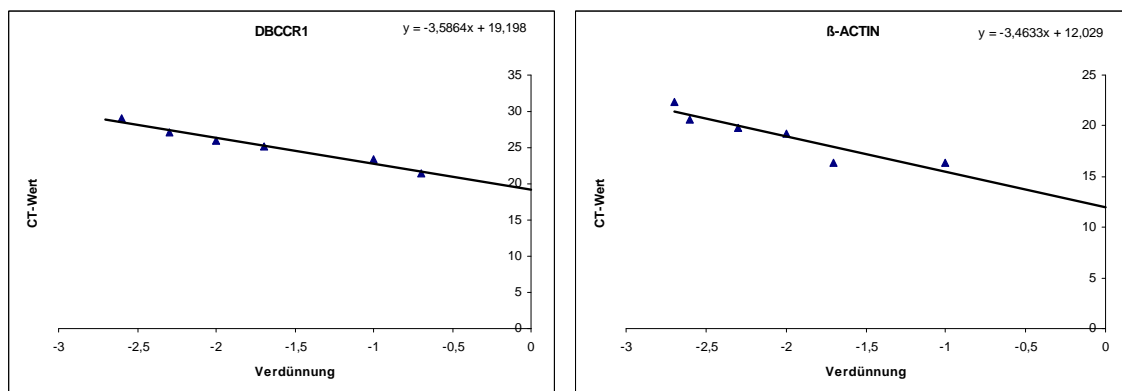
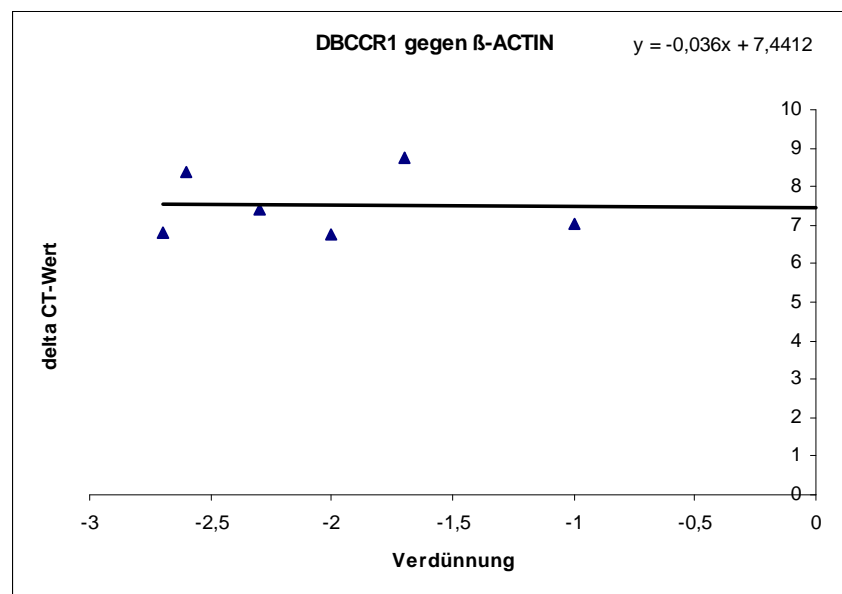


Abbildung 19: Grafische Darstellung der Effizienz-Testung der PCR für DBCCR1 (oben links) und β -ACTIN (oben rechts), sowie die Darstellung der Korrelation beider PCR-Effizienzen miteinander (unten).



3.4 Real-Time PCR Ergebnisse

Mit Hilfe der experimentell ermittelten ΔC_t -Werte wurde die relative Expression der drei Zielgene IL13R α 2, OLIG2 und DBCCR1 in jeder der 51 Tumorproben berechnet. Die erhobenen Daten wurden dann unter Berücksichtigung der Malignitätsgrade statistisch evaluiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse nach Zielgenen geordnet dargestellt.

3.4.1 IL13R α 2

In die statistische Auswertung der relativen Expression von IL13R α 2 gingen insgesamt nur 50 Proben ein, da die Analyse der Schmelzkurve im Anschluss an die Real-Time PCR bei einer Probe eines diffusen Astrozytoms nicht eindeutig das Vorliegen des gewünschten Amplifikates bestätigte.

Die Mittelwerte der relativen IL13R α 2-Expression in den Gruppen der diffusen und anaplastischen Astrozytome, sowie der Glioblastome zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Expression lag in allen Gruppen um mehr als das Doppelte über der IL13R α 2-Expression in der Kalibratorprobe. Allerdings fand sich in der Gruppe der Glioblastomrezidive eine vergleichsweise niedrige Expression, die nur bei ca. 18% der Expression in der Kalibratorprobe lag.

In der weiteren statistischen Auswertung konnte festgestellt werden, dass die Expressionsunterschiede zwischen den Glioblastomen und deren Rezidiven signifikant waren ($p=0,014$). Obwohl der Vergleich der Expressionsunterschiede zwischen den anaplastischen Astrozytomen und den Glioblastomrezidiven eine ähnliche Tendenz zeigte, war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,106$).

Histologie	Mittelwert der relativen Expression	N	Standardabweichung
Diffuse Astrozytome	2,0394	5	4,40500
Anaplastische Astrozytome	2,5078	11	4,33894
Glioblastome	2,7831	23	4,66436
Rezidivglioblastome	0,1787	11	0,25457

Tabelle 8: Mittelwerte der relativen IL13R α 2-Expressionen nach Tumorgaden.

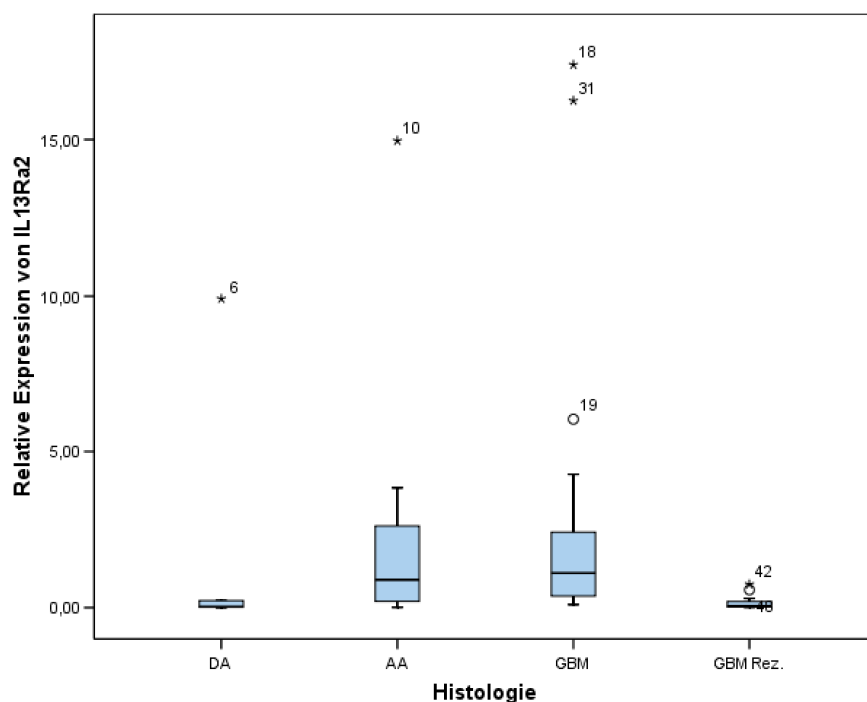


Abbildung 20: Boxplot-Darstellung der relativen IL13Rα2-Expressionen nach Tumorgraden.

In einer weiteren Auswertung wurden speziell bei der Analyse der IL13Rα2-Expression die anaplastischen Astrozytome und die Glioblastome als unbehandelte Tumoren zusammengefasst und den Glioblastomrezidiven als behandelten Tumoren gegenübergestellt. Hierbei fanden sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gliomen vor und nach Behandlung mit Radiochemotherapie ($p=0,003$).

Therapie	Mittelwert der relativen Expression	N	Standardabweichung
Keine Radiochemotherapie	2,6941	34	4,49735
Radiochemotherapie	0,1787	11	0,25457

Tabelle 9: Mittelwerte der relativen IL13Rα2-Expressionen differenziert nach behandelten und unbehandelten Tumoren.

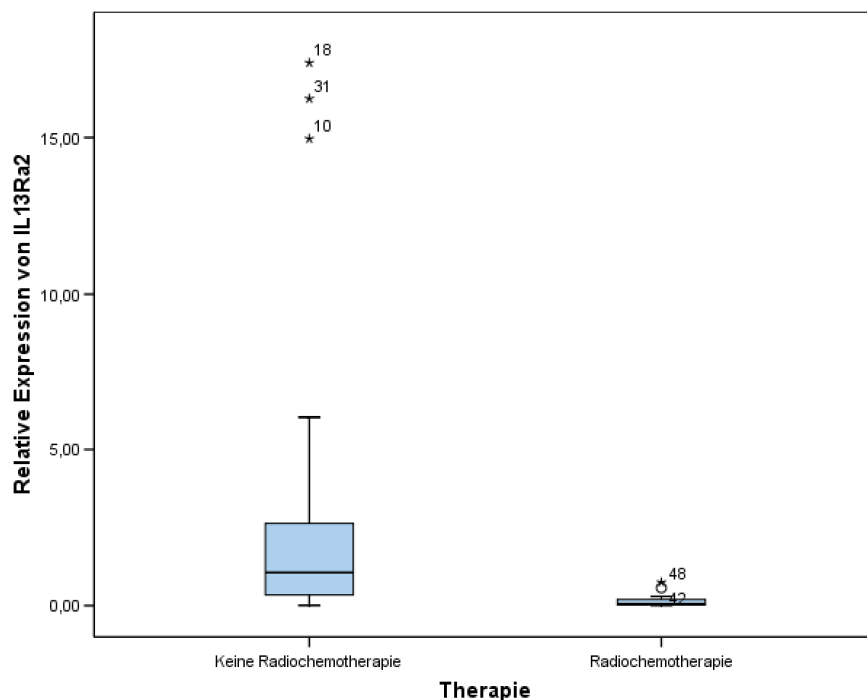


Abbildung 21: Boxplot-Darstellung der relativen IL13Rα2-Expressionen differenziert nach behandelten und unbehandelten Tumoren.

3.3.2 OLIG2

Der Vergleich der mittleren relativen Expression des Gens OLIG2 in den vier verschiedenen Tumorentitäten mit der Kalibratorprobe ergab insgesamt nur geringe Expressionslevel. Dennoch war auffällig, dass die Gruppe der anaplastischen Astrozytome eine fast viermal höhere OLIG2-Expression aufwies, als die übrigen Tumorgruppen. Die anaplastischen Astrozytome hatten dabei verglichen mit der Kalibratorprobe eine auf ca. 11,5% reduzierte OLIG2-Expression. Die anderen drei Entitäten zeigten mit einer auf knapp 3% reduzierten Expression nur einen Bruchteil der Expression in der Kalibratorprobe. Die statistische Auswertung ergab hier, dass der Expressionsunterschied zwischen den anaplastischen Astrozytomen gegenüber allen anderen Gruppen signifikant war. Im Einzelnen ergaben sich folgende p-Werte:

Diffuse Astrozytome gegen anaplastische Astrozytome → $p=0,026$

Glioblastome gegen anaplastische Astrozytome → $p=0,025$

Rezidivglioblastome gegen anaplastische Astrozytome → $p=0,031$

Histologie	Mittelwert der relativen Expression	N	Standardabweichung
Diffuse Astrozytome	0,0298	6	0,01850
Anaplastische Astrozytome	0,1146	11	0,11258
Glioblastome	0,0294	23	0,03512
Rezidivglioblastome	0,0285	11	0,05524

Tabelle 10: Mittelwerte der relativen OLIG2-Expressionen nach Tumorgraden.

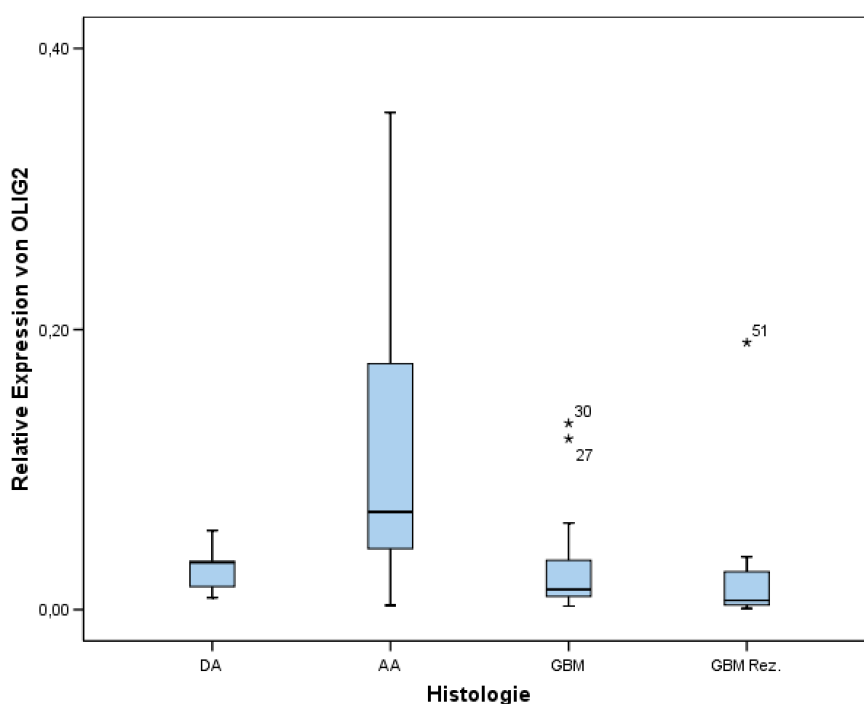


Abbildung 22: Boxplot-Darstellung der relativen OLIG2-Expressionen nach Tumorgraden.

3.3.3 DBCCR1

Die mittlere relative Expression des Gens DBCCR1 lag bei den diffusen Astrozytomen bei ca. 38%, bei den anaplastischen Astrozytomen bei ca. 84%, bei den Glioblastomrezidiven bei ca. 54% und bei den Glioblastomen bei ca. 59% der Expression in der Kalibratorprobe. Trotz dieser Unterschiede ließ sich hier aber keine statistische Signifikanz hinsichtlich der Expressionsunterschiede für DBCCR1 zwischen den einzelnen Malignitätsgraden feststellen.

Histologie	Mittelwert der relativen Expression	N	Standardabweichung
Diffuse Astrozytome	0,3807	6	0,27966
Anaplastische Astrozytome	0,8411	11	0,93942
Glioblastome	0,5389	23	1,23674
Rezidivglioblastome	0,5905	11	0,47410

Tabelle 11: Mittelwerte der relativen DBCCR1-Expressionen nach Tumorgraden.

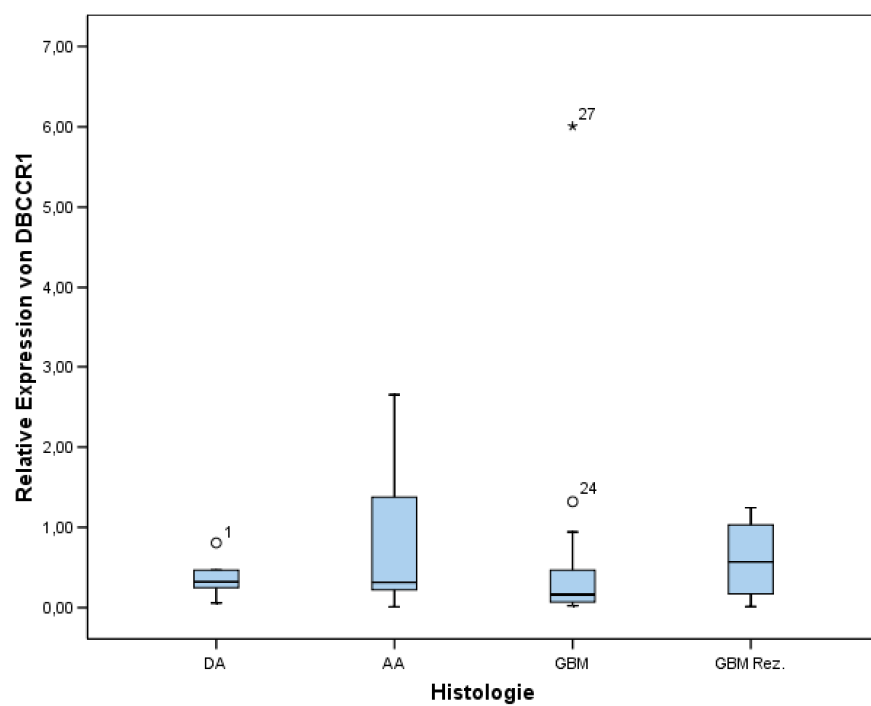


Abbildung 23: Boxplot-Darstellung der relativen DBCCR1-Expressionen nach Tumorgraden

4. Diskussion

4.1 Versuchsaufbau

Im folgenden Abschnitt werden die Vor- und Nachteile einiger Aspekte des gewählten Versuchsaufbaues diskutiert.

4.1.1 Auswahl des Probenmaterials

In der vorliegenden Arbeit wurde natives Tumorgewebe untersucht, welches nach der Resektion kryokonserviert wurde. Eine mögliche Alternative zu Nativgewebe stellen in Kulturen kultivierte Tumorzellen dar. Beide Arten von Probenmaterial weisen Vor- und Nachteile auf.

Die Kultivierung von Zellen außerhalb des menschlichen Körpers stellt hohe Anforderungen an die künstlich geschaffenen Lebensbedingungen dar. Fehlende Zell-zu-Zell Interaktion, sowie neuronale und endokrine Einflüsse müssen in-vitro nachgeahmt werden, wobei gleichzeitig ungewollte Einflüsse möglichst effektiv ausgeschaltet werden sollten. Die molekularbiologischen Vorgänge hierbei sind sehr komplex, so dass Zellkulturen häufig nur ein unvollständiges Abbild der realen Einflüsse auf das Proliferations- und Interaktionsverhalten der kultivierten Zellen darstellen. Neben einer erkennbaren Dedifferenzierung kann es somit zu einer Adaptation der Zellen an die herrschenden Bedingungen oder zu einer monoklonalen Selektion kommen. Dies führt zu einer potentiell eingeschränkten Übertragbarkeit der in-vitro gewonnenen Ergebnisse auf die tatsächlich ablaufenden Vorgänge in-vivo (*Freshney, 2000*).

Wichtigster Vorteil von Zellkulturen gegenüber nativem Probenmaterial ist die Möglichkeit, eine große Menge Zellen für die Durchführung der Untersuchungen zu produzieren (*Freshney, 2000*). Dies erleichtert sowohl die Verifikation der gewonnenen Ergebnisse, als auch die Durchführung alternativer Untersuchungsverfahren. Gerade aufgrund der klinischen Relevanz einer histopathologischen Diagnosestellung und Einteilung in die unterschiedlichen

WHO-Grade bei diffus infiltrierenden Astrozytomen standen für die Durchführung der vorliegenden Arbeit nur begrenzte Mengen von Tumorgewebe zur Verfügung. Der überwiegende Teil der jeweiligen Resektate wurde für die neuropathologische Untersuchung verwendet. Entsprechend waren die experimentellen Möglichkeiten und die Toleranz gegenüber z.B. Präparationsfehler limitiert.

Eine weitere Eigenart nativer Gewebeproben ist, dass sie in der Regel nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass ausschließlich eine Entität von Zellen vorliegt. Gerade aufgrund des diffus infiltrierenden Wachstumsverhaltens der hier untersuchten Malignome kann in dem Probenmaterial neben Tumor- auch Normalgewebe enthalten sein. Nach der RNA-Isolierung ist in dem Eluat somit ein Gemisch aus RNA von Zellen unterschiedlicher Dignität enthalten. Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen deshalb den Zellen, die in der Gewebeprobe überwiegen. Veränderungen, die nur wenige Zellen betreffen, bleiben somit unbeobachtet.

Da es sich aber bei den untersuchten Tumorproben nur um einen Teil des gesamten operativ entfernten Gewebes handelte, besteht die Möglichkeit, dass der histopathologisch diagnostizierte Tumorabschnitt nicht dem genetisch untersuchten Tumorgewebe entspricht. Demzufolge kann nicht mit absoluter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Einordnung einer Tumorprobe in eine histologische Gruppe und der tatsächlich Malignitätsgrad des untersuchten Gewebestückes übereinstimmen. Zusätzlich konnten *Jung et al. (1999)* zeigen, dass gerade Glioblastome auch auf genetischer Ebene eine deutliche Heterogenität der Tumorzellen aufweisen. Unterstrichen wird dieser Umstand zusätzlich durch die Diskussion über eine weitere Unterteilung der Glioblastome in die Gruppen der Glioblastome mit und ohne oligodendroglialer Komponente (*He et al., 2001*).

Als weitere Anmerkung bezüglich der Gewinnung und Verwendung von nativen Tumorproben sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass versucht wurde, die Zeitspanne zwischen Resektion und Kryokonservierung des Gewebes so gering wie möglich zu halten. Dennoch existieren hierbei, bedingt durch die

Arbeitsabläufe während der Operation, zwischen den einzelnen Proben Unterschiede. Ebenso bestehen Schwankungen hinsichtlich der intraoperativen Ischämiezeit des Gewebes. Dadurch könnten es durchaus über die Aktivierung von Enzymen zu relevanten molekularbiologischen Alterationen gekommen sein.

4.1.2 Relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR

Es existiert eine Vielzahl von molekularbiologischen Methoden, die zur Charakterisierung und Quantifizierung von mRNA Expressionsmustern geeignet sind. Dazu zählen unter anderem Northern Blotting, Nuclease Protection Assays (NPA), In Situ Hybridization (ISH), die quantitative PCR mit und ohne Standard, sowie die kompetitive PCR.

Für die Durchführung der relativen Quantifizierung der Expression der Zielgene IL13R α 2, OLIG2 und DBCCR1 wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der Real-Time RT-PCR gewählt. Die Entscheidung für die Real-Time RT-PCR fiel aufgrund einer Reihe von Vorteilen. Wichtigster Vorteil der Real-Time RT-PCR gegenüber den alternativen Methoden ist ihre hohe Sensitivität (*Heid et al., 1996*). Desweiteren handelt sich um eine dynamische Messung und nicht um eine Endpunktbestimmung. Durch die kontinuierliche Registrierung des Anstiegs der Amplifikatmenge während der PCR ist es möglich, genauere Aussagen über die Ausgangsmenge der cDNA bzw. mRNA des Zielgenes zu machen. Gleichzeitig weisen Real-Time RT-PCR Ergebnisse eine höhere Reproduzierbarkeit auf. Ein weiterer Vorteil ist der hohe Probendurchsatz der mittels Real-Time PCR erreicht werden kann. Desweiteren sinkt durch den Wegfall der bei der konventionellen PCR notwendigen post-PCR Verarbeitungsschritte (z.B. Gelelektrophorese, Densiometrie oder Southern Blotting) die Zahl möglicher Fehler- und Kontaminationsquellen (*Heid et al., 1996*).

Für die Detektion der Amplifikatmenge während der Real-Time PCR ist eine Fluoreszenzquelle notwendig. Hierfür stehen neben dem Farbstoff SYBR Green I eine Reihe von weiteren Möglichkeiten, wie z.B. TaqMan- oder Hybridisations-

Sonden und Molecular Beacons, zur Verfügung. SYBR Green I zeichnet sich hierbei durch seine relativ einfache Handhabung und seine vergleichsweise niedrigen Kosten aus. Dieser Farbstoff besitzt die Eigenschaft, sich in den entstehenden DNA-Doppelstrang einzulagern und darauf mit einer Steigerung der Eigenfluoreszenz zu reagieren. Dadurch wird es möglich die Verlängerung des Amplifikates über die Zunahme der Fluoreszenz zu detektieren. Diese Eigenschaft birgt aber auch den wichtigsten Nachteil, den SYBR Green I besitzt. Da es sich unspezifisch in alle entstehenden DNA-Doppelstränge einlagert, können Primer-Dimere und falsche PCR-Produkte ebenfalls zu einer Zunahme der Fluoreszenz führen (*Morrison et al., 1998*). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Nachteil durch die gründliche Überprüfung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse auf ungewünschte Amplifikate und Primer-Dimere, ausgeglichen (*Ririe et al., 1997*).

Die Entscheidung, die mRNA-Expression der Zielgene in den einzelnen Tumorproben normalisiert anhand eines passenden Housekeeping-Gens und relativ zu einer Kalibratorprobe zu quantifizieren, fiel aufgrund der im folgenden genannten Überlegungen.

Einerseits war für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit das relative Verhältnis der Genexpression in den untersuchten Tumorgruppen entscheidend, weshalb eine absolute Quantifizierung, die insgesamt als störanfälliger gilt, nicht notwendig war.

Andererseits bietet die Normalisierung anhand eines Housekeeping-Gens den Vorteil, dass die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert wird. Dies liegt an der Ausschaltung von Gewebe- und Matrixeffekten, sowie unterschiedlicher RNA-Extraktionseffizienzen und Fehlern bei der reversen Transkription. Grund hierfür ist, dass innerhalb einer Probe sowohl Zielgen, als auch Housekeeping-Gen gleichermaßen von diesen Einflüssen betroffen sind und sich somit die individuellen Probeneffekte bei der mathematischen Auswertung wieder aufheben. Für diese Auswertung ist die $\Delta\Delta C_T$ -Methode, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, die am weitesten verbreitete. Sie liefert gut reproduzierbare Ergebnisse, die allerdings mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet sind. Dies ist darin begründet, dass die $\Delta\Delta C_T$ -Methode

eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem Zyklus voraussetzt, man geht also von einer PCR-Effizienz von 100% aus. In der Praxis ist diese aber geringer, so dass z.B. in der vorliegenden Arbeit eine Effizienz von über 85% als ausreichend akzeptiert wurde (*Livak et al., 2001*). Dies führt jedoch zu Abweichungen der tatsächlichen und gemessenen Expressionsunterschieden der untersuchten Gene. Um diesen Fehler möglichst gering zu halten, wurden in der vorliegenden Arbeit darauf geachtet, dass jeweils Ziel- und Housekeeping-Gene einander zugeordnet wurden, die sich in der PCR-Effizienz nur minimal unterscheiden.

4.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.2.1 IL13R α 2

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse für IL13R α 2 ergab für die diffusen und anaplastischen Astrozytome, sowie die Glioblastome sehr ähnliche, jedoch vergleichsweise hohe Expressionslevel. Dieses Ergebnis ist ein wichtiger Hinweis dafür, dass IL13R α 2 keine Rolle für den malignen Progress von einem WHO-Grad II zu einem WHO-Grad IV Astrozytom spielt. Dennoch ist es denkbar, dass IL13R α 2 eine Mitverantwortung für das unkontrollierte Wachstum dieser neuroepithelialen Tumoren trägt. *Rahaman et al. (2002)* postulierten für die IL13R α 2-Kette eine Funktion als Blindrezeptor für IL-13 und IL-4. IL-4 hat auf verschiedene Tumorzellen einen antimitotischen Effekt, der demzufolge im Falle eines vermehrten Vorkommens der IL13R α 2-Kette auf den Tumorzellen fehlen würde. Trotzdem ist die Akkumulation anderer genetischer Alterationen sicherlich von einer größeren Bedeutung, da zwischen den einzelnen Tumorgaden große Unterschiede bezüglich der Proliferationsrate bestehen.

Das interessantere Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die statistisch signifikant niedrigere Expression von IL13R α 2 in Glioblastomrezidiven verglichen mit unbehandelten Glioblastomen, sowie die ähnliche Tendenz im Vergleich zwischen anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomrezidiven. Diese beobachteten Unterschiede zwischen unbehandelten und mit

Radiochemotherapie behandelten Tumorgewebe lässt Raum für zwei Interpretationen.

Zum einen wurde von einigen Autoren beobachtet, dass die Überexpression von IL13R α 2 einen antitumorösen Effekt besitzt. *Kawakami et al. (2001)* beobachteten beispielsweise, dass die Überexpression von IL13R α 2 in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 zunächst einen starken inhibitorischen Effekt auf die Tumorgenese besitzt. Mit abnehmender Expression kam es dann aber wieder zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen. Dies könnte übertragen auf das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bedeuten, dass die Herunterregulierung von IL13R α 2 die Entstehung eines Glioblastomrezidivs begünstigt.

Zum anderen könnte eine niedrige IL13R α 2-Expression einen selektiven Vorteil für die jeweiligen Tumorzellen darstellen. Nach der bereits weiter oben angesprochenen These von *Rahaman et al. (2002)* verhindert der IL13R α 2-Rezeptor über seine Funktion als Blindrezeptor die IL-4 abhängige Signaltransduktion in Tumorzellen. IL-4 besitzt normalerweise einen antimitotischen Effekt, der in diesem Falle fehlt. Da Zellen vor allem in bestimmten Phasen des Zellzyklus für die Strahlen- und Chemotherapie angreifbar sind, haben somit Zellen mit einer niedrigen IL13R α 2-Expression durch ihre langsamere Proliferation einen selektiven Vorteil, da sie mit einer größeren Wahrscheinlichkeit die Therapie überleben. Damit könnten sie den Ausgangspunkt für Glioblastomrezidive bilden. Entgegenstehen würde dieser Theorie jedoch, dass sich gerade Glioblastomrezidive verglichen mit primären Glioblastomen häufig durch eine höhere Proliferationsrate auszeichnen. Wobei hierfür sicherlich auch andere genetische Veränderungen verantwortlich sein können.

Ein wichtiger weiterer Diskussionspunkt ist die Anwendung des Zytotoxins IL13-PE38QQR als selektives Therapeutikum für die Therapie von Glioblastomen und deren Rezidive. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit weist darauf hin, dass gerade die Therapie von Glioblastomrezidiven mit dem Zytotoxin weniger erfolgreich sein könnte, als die Therapie von primären Glioblastomen. Die niedrigere Expression der IL13R α 2-mRNA deutet auf ein geringeres Vorkommen der Zielstruktur dieses Medikamentes auf den Zellen von

Rezidiven hin, so dass es schwieriger wird, die toxische Konzentration an den Tumorzellen zu erreichen.

4.2.2 OLIG2

In der vorliegenden Arbeit war es möglich, in allen untersuchten Tumorproben eine OLIG2-Expression mittels Real-Time PCR nachzuweisen. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen einer Reihe von anderen Autoren, die mittels diverser molekularbiologischer Untersuchungsmethoden ebenfalls eine OLIG2-Expression in diffus infiltrierenden Astrozytomen der verschiedenen WHO-Grade nachweisen konnten (*Aguirre-Cruz et al., 2004; Riemenschneider et al., 2004; Yokoo et al., 2004; Ligon et al., 2004; Mokhtari et al., 2005*). Damit unterstützt auch die vorliegende Arbeit, dass OLIG2 nicht, wie zuvor z.B. von *Lu et al. (2001)* angenommen, als spezifischer genetischer Marker für Oligodendrogliome genutzt werden kann.

Das hier berichtete Ergebnis einer signifikant erhöhten OLIG2-Expression in anaplastischen Astrozytomen gegenüber allen anderen untersuchten Malignitätsgraden, entspricht in weiten Teilen dem Ergebnis von *Mokhtari et al. (2005)*. Auch diese Gruppe hatte in ihren Studien immunohistochemisch eine gegenüber dem WHO-Grad II stark erhöhte OLIG2-Expression in WHO-Grad III Tumoren festgestellt. Diese Beobachtung traf sowohl auf reine Astrozytome, als auch auf Oligoastrozytome und reine Oligodendrogliome zu. Hinzu kam, dass die niedrigste OLIG2-Expression in Glioblastomen gemessen wurde. Die vorliegende Arbeit konnte somit diesen auf Protein-Ebene geführten Nachweis auf der RNA-Ebene bestätigen.

In ihren Untersuchungen der Gliome fanden *Mokhtari et al. (2005)* zwei unterschiedliche Formen von Zellen. Die erste Gruppe von Tumorzellen färbte sich positiv für das OLIG2-Protein, aber negativ für das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Die andere Gruppe verhielt sich in der immunohistochemischen Färbung umgekehrt.

Reine Oligodendrogliome setzten sich dabei ausschließlich aus OLIG2+/GFAP-Zellen zusammen, wohingegen in Oligoastrozytome und Astrozytome beide

Zellspezies gefunden wurden. Dabei zeigte sich in Astrozytomen ein relativ vermehrtes und ubiquitäres Vorkommen von OLIG2-/GFAP+ Zellen und in Oligoastrozytomen ein relatives Überwiegen der OLIG2+/GFAP- Zellen.

Da reine Oligodendrogliome in der Regel besser auf Chemotherapeutika ansprechen, als Astrozytome, ist davon auszugehen, dass OLIG2+/GFAP- Zellen sensibler für diese Form der Therapie sind. Diese Beobachtung, verbunden mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, könnte darauf hinweisen, dass Glioblastome wegen dem geringen Vorkommen von OLIG2+/GFAP- Tumorzellen vergleichsweise schlecht auf Chemotherapeutika ansprechen. Somit könnte eine Expressionsbestimmung von OLIG2 in astrozytären Tumoren zur Erfolgsabschätzung einer Chemotherapie genutzt werden. Fraglich bleibt jedoch, ob sich hieraus ein wirklicher prognostischer Nutzen ergibt oder es vielmehr zu einer Selektion der möglicherweise weniger chemosensitiven OLIG2-/GFAP+ Zellen kommt.

Fukuda et al. (2004) und *Setoguchi et al. (2004)* beschrieben in ihren Untersuchungen die Rolle von OLIG2 als Gegenspieler der Astrozytendifferenzierung. Sie zeigten, dass OLIG2 über die Verhinderung der Komplexbildung zwischen dem Transkriptions-Coaktivator p300 und STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) zu einer verminderten Expression von GFAP führt. Da GFAP ein wichtiger Promotor der Astrozytendifferenzierung darstellt, ergeben sich in Verbindung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zwei denkbare Begründungen für die vergleichsweise hohe OLIG2-Expression in der Gruppe der anaplastischen Astrozytome.

Zum einen könnte die gesteigerte OLIG2-Expression einen Versuch der Tumorzellen darstellen, eine weitere Proliferation durch die Expression eines negativen Regulators zu verhindern. Dafür würde sprechen, dass in den schnell wachsenden Glioblastomen eine reduzierte OLIG2-Expression zu verzeichnen ist. In den diffusen Astrozytomen WHO-Grad II müsste jedoch ein anderer Mechanismus für eine niedrigere Proliferationsrate sorgen, da hier ebenfalls eine geringe OLIG2-Expression messbar war.

Zum anderen könnte es sich gerade bei anaplastischen Astrozytomen um vergleichsweise heterogene Tumoren handeln, die einen relativ hohen Anteil an

oligodendroglial differenzierten Zellen beinhalten. Zwar wurden in dieser Arbeit ausschließlich anaplastische Astrozytome untersucht, die nach der histopathologischen Beurteilung keine oligodendrogliale Komponente besaßen, jedoch ist es denkbar, dass sich die Ausgangszellen der Tumoren zunächst sowohl in die oligodendrogliale, als auch in die astrozytäre Richtung differenzieren und erst zusätzliche Einflüsse zum Überwiegen einer der beiden Komponenten führt.

Die Beobachtungen durch die vorliegende Arbeit, dass zwischen den OLIG2-Expressionen in den Glioblastomen und den Glioblastomrezidiven kein nennenswerter Unterschied besteht, weist darauf hin, dass dieses Gen keine Relevanz für die Rezidivierungstendenz dieser Tumoren besitzt.

4.2.3 DBCCR1

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Expression von DBCCR1 in den verschiedenen untersuchten Tumorgruppen geben keinen Hinweis darauf, dass DBCCR1 in den Malignisierungsprozess von einem WHO-Grad II zu einem WHO-Grad IV Astrozytom involviert ist. Ebenso besteht kein Anhaltspunkt dafür, dass die DBCCR1-Expression durch die Behandlung der Tumoren mit Radiochemotherapie beeinflusst wird oder dass dieses Gen für die Rezidivierungstendenz von Glioblastomen verantwortlich ist.

Beetz et al. (2005) hatten in ihrer Studie an verschiedengradigen Astrozytomen eine inverse Korrelation der DBCCR1-Expression mit dem Tumorgrad beschrieben. Dieses Ergebnis veranlasste sie zu der Vermutung, dass DBCCR1 in Astrozytomen, ähnlich wie auch für Harnblasenkarzinome beschrieben, als Tumorsuppressor fungieren könnte. Entscheidend für diese Funktion ist der teilweise beobachtete LOH, häufiger ist jedoch eine funktionelle Inaktivierung der Promotorregion für DBCCR1 über eine Hypermethylierung der 5' CpG-Insel. *Beetz et al. (2005)* konnten in ihren Untersuchungen zwar keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Tumorgraden nachweisen. Trotzdem zeigte sich aber eine konstante Abnahme

der DBCCR1-Expression von den diffusen Astrozytomen hin zu den Glioblastomen. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnten diese Tendenz nicht bestätigen. Ganz im Gegenteil fand sich in den hier durchgeführten Untersuchungen die niedrigste DBCCR1-Expression in den diffusen Astrozytomen. Diese Beobachtung macht zumindest die These, dass der Funktionsverlust dieses Tumorsuppressors für die Malignisierung der Astrozytome mitverantwortlich ist, unwahrscheinlicher.

4.3 Weiterführende Untersuchungen

Die hier präsentierten Ergebnisse beruhen auf der Ermittlung der relativen mRNA-Expression der drei Zielgene IL13R α 2, OLIG2 und DBCCR1 mittels Real-Time PCR in Tumorproben von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade. Durch verschiedene post-transkriptionelle und post-translationelle Faktoren kann es jedoch zu einer Diskrepanz zwischen dem mRNA-Expressionslevel und der sezernierten Menge an Protein kommen. Demzufolge wäre in weiterführenden Untersuchungen eine Mengenbestimmung des jeweiligen Proteins in den verschiedenen Tumorentitäten sinnvoll. Dabei liefern die Ergebnisse der mRNA-Bestimmung aber entscheidende Hinweise, da die mRNA die Schlüsselposition für die Bildung der entsprechenden Proteine einnimmt und ihre Expression deshalb häufig auch mit Ergebnissen des Proteinnachweises korrelieren.

Dementsprechend scheint eine weitere Untersuchung von DBCCR1 hinsichtlich einer Funktion bei der Malignisierung von astrozytären Tumoren nicht viel versprechend zu sein, da hierfür bereits auf mRNA-Ebene keine Anhaltspunkte zu finden sind. Eine weitere Untersuchung von IL13R α 2 und OLIG2 scheint aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hingegen als sinnvoll.

Um validere Ergebnisse zu erhalten sollte in jedem Fall die Anzahl der untersuchten Proben der einzelnen Malignitätsgrade weiter erhöht werden.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Aguirre-Cruz L., Mokhtari K., Hoang-Xuan K., Marie Y., Criniere E., Taillibert S., Lopes M., Delattre J.Y., Sanson M., "Analysis of the bHLH transcription factors Olig1 and Olig2 in brain tumors.", *J Neurooncol.* 67(3) (2004): 265-71.
 - [2] Albert F.K., Forsting M., Sartor K., Adams H.P., Kunze S., "Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis.", *Neurosurgery.* 34(1) (1994):45-60.
 - [3] Aman M.J., Tayebi N., Obiri N.I., Puri R.K., Modis W.S., Leonard W.J., "cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor α chain." *J Biol Chem.* 271(46) (1996): 29265-70.
 - [4] Applied Biosystems, "ABI Prism 7700 Sequence Detection System – User's Manual".
 - [5] Applied Biosystems "User Bulletin #2 – ABI Prism 7700 Sequence Detection System", December 11, 1997 (updated 10/2001), P/N 4303859B
 - [6] Bailey P., Cushing H., "A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with correlated study of prognosis.", J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1926.
 - [7] Beetz C., Brodoehl S., Patt S., Kalff R., Deufel T., "Low expression but infrequent genomic loss of the putative tumour suppressor DBCCR1 in astrocytoma.", *Oncol Rep.* 13(2) (2005): 335-40.
 - [8] Berger M.S., Deliganis A.V., Dobbins J., Keles G.E., "The effect of extent of resection on recurrence in patients with low grade cerebral hemisphere gliomas.", *Cancer.* 74(6) (1994):1784-91.
 - [9] Böcker W., Denk H., Heitz P.: „Pathologie“, 2. Auflage, Urban & Fischer, 2001
 - [10] Bonham M.J., Danielpour D., "Improved Purification and Yield of RNA by RNeasy.", *Biotechniques.* 21(1) (1996): 57-60.
 - [11] Bozinov O., Köhler S., Samans B., Benes L., Miller D., Farhoud A., Ritter M., Sure U., Bertalanffy H., "Candidate genes for the progression of malignant gliomas identified by microarray analysis.", *Neurosurg Rev.* 31(1) (2008): 83-9; discussion: 89-90; Erratum *Neurosurg Rev* 31(2) (2008): 247-8.
-

-
- [12] Caput D., Laurent P., Kaghad M., Lelias J.M., Lefort S., Vita N., Ferrara P., "Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor α chain." *J Biol Chem.* 271(28) (1996): 16921-26.
- [13] Chomczynski P., Sacchi N., "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.", *Anal Biochem.* 162(1) (1987): 156-59.
- [14] Curran W.J. Jr., Scott C.B., Horton J., Nelson J.S., Weinstein A.S., Fischbach A.J., Chang C.H., Rotman M., Asbell S.O., Krisch R.E., Nelson D.F., "Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials.", *J Natl Cancer Inst.* 85(9) (1993): 704-10.
- [15] Davis F.G., McCarthy B.J., Freels S., Kupelian V., Bondy M.L., "The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors. Surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data.", *Cancer* 85 (1999): 485-491.
- [16] Debinski W., Obiri N.I., Powers S.K., Pastan I., Puri R.K., "Human glioma cells overexpress receptor for interleukin 13 and are extremely sensitive to a novel chimeric protein composed of interleukin 13 and *Pseudomonas* exotoxin." *Clin Cancer Res.* 1(11) (1995): 1253-58.
- [17] Debinski W., Gibo D.M., Obiri N.I., Kealiher A., Puri R.K., "Novel anti-brain tumor cytotoxins specific for cancer cells." *Nat Biotechnol.* 16(5) (1998): 449-53.
- [18] Debinski W., Gibo D.M., Hulet S.W., Connor J.R., Gillespie G.Y., "Receptor for Interleukin 13 Is a Marker and Therapeutic Target for Human High-Grade Gliomas." *Clin Cancer Res.* 5(5) (1999): 985-90.
- [19] Diener H. C., Putzki N.: „Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie“, 4. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2008.
- [20] Donaldson D.D., Whitters M.J., Fitz L.J., Neben T.Y., Finnerty H., Henderson S.L., O'Hara R.M., Beier D.R., Turner K.J., Wood C.R., Collins M., "The Murine IL-13 Receptor $\alpha 2$: Molecular Cloning, Characterization, and Comparison with Murine IL-13 Receptor $\alpha 1$." *J Immunol.* 161(5) (1998): 2317-24.
- [21] Edwards M.S., Terry J.G., Montebello J.F., Hornback N.B., Kuharik M.A., "Gliomas in children following radiation therapy for lymphoblastic leukaemia.", *Acta Radiol Suppl.* 369 (1986): 651-53.
- [22] Fine H.A., Dear K.B., Loeffler J.S., Black P.M., Canellos G.P., "Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults.", *Cancer.* 71(8) (1993): 2585-97.
-

- [23] Förster T., "Intermolecular energy migration and fluorescence.", *Ann Phys* 2 (1948): 55-75.
 - [24] Freije W.A., Castro-Vargas F.E., Fang Z., Horvath S., Cloughesy T., Liao L.M., Mischel P.S., Nelson S.F., "Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival.", *Cancer Res.* 64(18) (2004): 6503-10.
 - [25] Freshney I.R.: "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th Edition", Wiley-Liss, New York, 2000.
 - [26] Fukuda S., Kondo T., Takebayashi H., Taga T., "Negative regulatory effect of an oligodendrocytic bHLH factor OLIG2 on the astrocytic differentiation pathway.", *Cell Death Differ.* 11(2) (2004): 196-202.
 - [27] Goa S., Worm J., Guldberg P., Eiberg H., Krogdahl A., Sørensen J.A., Liu C.J., Reibel J., Dabelsteen E., "Loss of heterozygosity at 9q33 and hypermethylation of the DBCCR1 gene in oral squamous cell carcinoma.", *Br J Cancer.* 91(4) (2004): 760-64.
 - [28] Habuchi T., Yoshida O., Knowles M.A., "A novel candidate tumour suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 840 kb YAC.", *Hum Mol Genet.* 6(6) (1997): 913-19.
 - [29] Habuchi T., Luscombe M., Elder P., Knowles M.A., "Structure and Methylation-Based Silencing of a Gene (DBCCR1) within a Candidate Bladder Cancer Tumor Suppressor Region at 9q32-33.", *Genomics.* 48(3) (1998): 277-88.
 - [30] Hall W.A., "The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions." *Cancer.* 82(9) (1998): 1749-55.
 - [31] He J., Mokhtari K., Sanson M., Marie Y., Kujas M., Huguet S., Leurand P., Capelle L., Delattre J.Y., Poirier J., Hoang-Xuan K., "Glioblastoma with an oligodendroglial component: a pathological and molecular study.", *J Neuropathol Exp Neurol* 60 (2001): 863–71.
 - [32] Heid A.C., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., "Real Time Quantitative PCR.", *Genome Res.* 6(10) (1996): 986-94.
 - [33] Hentschel S.J., Sawaya R., "Optimizing outcomes with maximal surgical resection of malignant gliomas.", *Cancer Control.* 10(2) (2003): 10914.
 - [34] Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R., "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.", *Biotechnology (NY).* 11(9) (1993): 1026-30.
 - [35] Hoang-Xuan K., Aguirre-Cruz L., Mokhtari K., Marie Y., Sanson M., "OLIG-1 and 2 gene expression and oligodendroglial tumours.", *Neuropathol Appl Neurobiol.* 28(2) (2002): 89-94.
-

-
- [36] Hölper B.M., Soldner F., Behr R.: "Kompendium Neurochirurgie", proINN-Verlag Rosenheim, 2006.
- [37] Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H., "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.", *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(16) (1991): 7276-80.
- [38] Husain S.R., Obiri N.I., Parkash G., Tong Z., Pastan I., Debinski W., Puri R.K., "Receptor for Interleukin 13 on AIDS-associated Kaposi's Sarcoma Cells Serves as a New Target for a Potent *Pseudomonas* Exotoxin-based Chimeric Toxin Protein." *Clin Cancer Res*. 3(2) (1997): 151-6.
- [39] Husain S.R., Puri R.K., "Interleukin-13 receptor-directed cytotoxin for malignant glioma therapy: from bench to bedside." (Review) *J Neurooncol*. 65(1) (2003): 37-48.
- [40] Ichimura K., Ohgaki H., Kleihues P., Collins V.P., "Molecular pathogenesis of astrocytic tumors.", *J Neurooncol*. 70(2) (2004): 137-60.
- [41] Izumi H., Inoue J., Yokoi S., Hosoda H., Shibata T., Sunamori M., Hirohashi S., Inazawa J., Imoto I., "Frequent silencing of DBC1 is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers.", *Hum Mol Genet*. 14(8) (2005): 997-1007.
- [42] Joshi B.H., Plautz G.E., Puri R.K., "Interleukin-13 receptor α chain: a novel tumor-associated transmembrane protein in primary explants of human malignant gliomas." *Cancer Res*. 60(5) (2000): 1168-72.
- [43] Karim A.B., Maat B., Hatlevoll R., Menten J., Rutten E.H., Thomas D.G., Mascarenhas F., Horiot J.C., Parvinen L.M., van Reijn M., Jager J.J., Fabrini M.G., van Alphen A.M., Hamers H.P., Gaspar L., Noordman E., Pierart M., van Glabbeke M., "A randomized trial on dose-response in radiation of low-grade cerebral glioma: European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Study 22844.", *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 36(3) (1996): 549-56.
- [44] Karim A.B., Afra D., Cornu P., Bleehan N., Schraub S., De Witte O., Darcel F., Stenning S., Pierart M., van Glabbeke M., "Randomized trial on the efficacy of radiotherapy for cerebral low-grade glioma in the adult: European Organization for Research and Treatment of Cancer Study 22845 with the Medical Research Council Study BRO4: an interim analysis." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 52(2) (2002): 316-24.
- [45] Kawakami K., Kawakami M., Snoy P.J., Husain S.R., Puri R.K., "In vivo overexpression of IL-13 receptor α 2 chain inhibits tumorigenicity of human breast and pancreatic tumors in immunodeficient mice." *J Exp Med*. 194(12) (2001): 1743-54.
-

- [46] Kawakami K., Taguchi J., Murata T., Puri R.K., "The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway." *Blood*. 97(9) (2001): 2673-79.
 - [47] Kawakami K., Kioi M., Liu Q., Kawakami M., Puri R.K., "Evidence that IL-13R alpha2 chain in human glioma cells is responsible for the antitumor activity mediated by receptor-directed cytotoxin therapy." *J Immunother* (1997). 28(3) (2005): 193-202.
 - [48] Kawakami M., Leland P., Kawakami K., Puri R.K., "Mutation and functional analysis of IL-13 receptor in human malignant glioma cells." *Oncol Res*. 12(11-12) (2001): 459-67.
 - [49] Kawakami M., Kawakami K., Puri R.K., "Intratumor Administration of Interleukin 13 Receptor-targeted Cytotoxin Induces Apoptotic Cell Death in Human Malignant Glioma Tumor Xenografts." *Mol Cancer Ther*. 1(12) (2002): 999-1007.
 - [50] Kawakami M., Kawakami K., Takahashi S., Abe M., Puri R.K., "Analysis of interleukin-13 receptor alpha2 expression in human pediatric brain tumors." *Cancer*. 101(5) (2004): 1036-42.
 - [51] Kioi M., Kawakami K., Puri R.K., "Analysis of Antitumor Activity of an Interleukin-13 (IL-13) Receptor-Targeted Cytotoxin Composed of IL-13 Antagonist and Pseudomonas Exotoxin." *Clin Cancer Res*. 10 (2004): 6231-38.
 - [52] Kioi M., Husain S.R., Croteau D., Kunwar S. Puri R.K., "Convection-enhanced delivery of interleukin-13 receptor-directed cytotoxin for malignant glioma therapy." (Review) *Technol Cancer Res Treat*. 5(3) (2006): 239-50.
 - [53] Kleihues P., Cavenee W.K., eds., "World Health Organisation Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System", Lyon: IARC-Press (2000).
 - [54] Kunwar S., Prados M.D., Chang S.M., Berger M.S., Lang F.F., Piepmeier J.M., Sampson J.H., Ram Z., Gutin P.H., Gibbson R.D., Aldape K.D., Croteau D.J., Sherman J.W., Puri R.K., Cintredekin Besudotox Intraparenchymal Study Group, "Direct intracerebral delivery of cintredekin besudotox (IL-13-PE38QQR) in recurrent malignant glioma: a report by the Cintredekin Besudotox Intraparenchymal Study Group.", *J Clin Oncol*. 25(7) (2007): 837-44.
 - [55] Laperriere N., Zuraw L., Cairncross G., "Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review.", *Radiother Oncol*. 64 (2002): 259-273.
-

-
- [56] Laws E.R., Parney I.F., Huang W., Anderson F., Morris A.M., Asher A., Lillehei K.O., Bernstein M., Brem H., Sloan A., Berger M.S., Chang S., Glioma Outcomes Investigators, "Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project.", *J Neurosurg.* 99(3) (2003): 467-73.
- [57] Lee S.K., Lee B., Ruiz E.C., Pfaff S.L., "Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells.", *Genes Dev.* 19(2) (2005): 282-94.
- [58] Lekan Deprez R.H., Fijnvandraat A.C., Ruijter J.M., Moorman A.F.M., "Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions." *Anal Biochem.* 307(1) (2002): 63-9.
- [59] Levin V.A., Silver P., Hannigan J., Wara W.M., Gutin P.H., Davis R.L., Wilson C.B., "Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report.", *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 18(2) (1990): 321-4.
- [60] Ligon K.L., Alberta J.A., Kho A.T., Weiss J., Kwaan M.R., Nutt C.L., Louis D.N., Stiles C.D., Rowitch D.H., "The Oligodendroglial Lineage Marker OLIG2 Is Universally Expressed in Diffuse Gliomas." *J Neuropathol Exp Neurol.* 63(5) (2004): 499-509.
- [61] Liu R., Cai J., Hu X., Tan M., Qi Y., German M., Rubenstein J., Sander M., Qiu M., "Region-specific and stage-dependent regulation of Olig gene expression and oligodendrogenesis by Nkx6.1 homeodomain transcription factor.", *Development.* 130(25) (2003): 6221-31.
- [62] Livak K.J., Schmittgen T.D., "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.", *Methods.* 25(4) (2001): 402-8.
- [63] Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., eds., "World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System.", Lyon: IARC-Press (2007).
- [64] Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvett A., Scheithauer B.W., Kleihues P., "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System", *Acta Neuropathol (Berl).* 114(2) (2007): 97-109.
- [65] Lu Q.R., Yuk D., Alberta J.A., Zhu Z., Pawlitzky I., Chan J., McMahon A.P., Stiles C.D., Rowitch D.H., "Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system.", *Neuron.* 25(2) (2000): 317-29.
-

-
- [66] Lu Q.R., Park J.K., Noll E., Chan J.A., Alberta J., Yuk D., Alzamora M.G., Louis D.N., Stiles C.D., Rowitch D.H., Black P.M., "Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors.", *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(19) (2001): 10851-56.
- [67] Lu Q.R., Sun T., Zhu Z., Ma N., Garcia M., Stiles C.D., Rowitch D.H., "Common Developmental Requirement for Olig Function Indicates a Motor Neuron/Oligodendrocyte Connection.", *Cell*. 109(1) (2002): 75-86.
- [68] Madhankumar A.B., Mintz A., Debinski W., "Interleukin 13 Mutants of Enhanced Avidity Toward the Glioma-Associated Receptor, IL-13R α 2." *Neoplasia*. 6(1) (2004): 15-22.
- [69] Marie Y., Sanson M., Mokhtari K., Leuraud P., Kujas M., Delattre J.Y., Poirier J., Zalc B., Hoang-Xuan K., "OLIG2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells.", *Lancet*. 358(9278) (2001): 298-300.
- [70] Marquardt T., Pfaff S.L., "Cracking the Transcriptional Code for Cell Specification in the Neural Tube." (Review), *Cell*. 106(6) (2001): 651-54.
- [71] Marras L.C., Geerts W.H., Perry J.R., "The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma.", *Cancer*. 89 (2000): 640-646.
- [72] Minty A., Chalon P., Derocq J.M., Dumont X., Guillemot J.C. et al., "Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses.", *Nature*. 362(6417) (1993): 248-50.
- [73] Mintz A., Gibo D.M., Slagle-Webb B., Christensen N.D., Debinski W., "IL-13R α 2 is a Glioma-Restricted Receptor for Interleukin-13." *Neoplasia*. 4(5) (2002): 388-99.
- [74] Mintz A., Gibo D.M., Madhankumar A.B., Debinski W., "Molecular targeting with recombinant cytotoxins of interleukin-13 receptor α 2-expressing glioma." *J Neurooncol*. 64(1-2) (2003): 117-23.
- [75] Mizuguchi R., Sugimori M., Takebayashi H., Kosako H., Nagao M., Yoshida S., Nabeshima Y., Shimamura K., Nakafuku M., "Combinatorial Roles of Olig2 and Neurogenin2 in the Coordinated Induction of Pan-Neuronal and Subtype-Specific Properties of Motoneurons.", *Neuron*. 31(5) (2001): 757-71.
- [76] Mokhtari K., Paris S., Aguirre-Cruz L., Privat N., Criniere E., Marie Y., Hauw J.J., Kujas M., Rowitch D., Hoang-Xuan K., Delattre J.Y., Sanson M., "Olig2 expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification." *Neuropathol Appl Neurobiol*. 31(1) (2005): 62-69.
-

-
- [77] Morrison T.B., Weis J.J., Wittwer C.T., "Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.", *Biotechniques*. 24(6) (1998): 954-62.
- [78] Mullis K.B., "Target amplification for DNA analysis by polymerase chain reaction.", *Ann Biol Clin (Paris)*. 48(8) (1990): 579-82.
- [79] Murad G.J.A., Walbridge S., Morrison P.F., Garmestani K., Degen J.W., Brechbiel M.W., Oldfield E.H., Lonser R.R., "Real-time, Image-Guided, Convection-Enhanced Delivery of Interleukin 13 Bound to Pseudomonas Exotoxin.", *Clin Cancer Res*. 12(10) (2006): 3145-51.
- [80] Murata T., Obiri N.I., Puri R.K., "Human ovarian-carcinoma cell lines express IL-4 and IL-13 receptor: comparison between IL-4- and IL-13-induced signal transduction." *Int J Cancer*. 70(2) (1997): 230-40.
- [81] Murata T., Husain S.R., Mohri H., Puri R.K., "Two different IL-13 receptor chains are expressed in normal human skin fibroblasts, and IL-4 and IL-13 mediate signal transduction through a common pathway." *Int Immunol*. 10(8) (1998): 1103-10.
- [82] Neglia J.P., Meadows A.T., Robison L.L., Kim T.H., Newton W.A., Ruymann F.B., Sather H.N., Hammond G.D., "Second neoplasms after acute lymphoblastic leukaemia in childhood.", *N Engl J Med*. 325(19) (1991): 1330-36.
- [83] Neuro-Oncology Working Group (NOA) of the German Cancer Society Neuro-Oncology Working Group., "(NOA)-01 trial of ACNU/VM26 versus ACNU/Ara-C chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma.", *J Clin Oncol* 21. (2003): 3276–3284.
- [84] Nishiyama H., Takehashi T., Kakehi Y., Habuchi T., Knowles M.A., "Homozygous Deletion at the 9q32-33 Candidate Tumor Suppressor Locus in Primary Human Bladder Cancer.", *Genes Chromosomes Cancer*. 26(2) (1999): 171-75.
- [85] Nishiyama H., Gill J.H., Pitt E., Kennedy W., Knowles M.A., "Negative regulation of G₁/S transition by the candidate bladder tumour suppressor gene DBCCR1.", *Oncogene*. 20(23) (2001): 2956-64.
- [86] Novitsch B.G., Chen A.I., Jessell T.M., "Identity and Pan-Neuronal Properties by the bHLH Repressor Olig2.", *Neuron*. 31(5) (2001): 773-89.
- [87] Nutt C.L., Mani D.R., Betensky R.A., Tamayo P., Cairncross J.G., Ladd C., Pohl U., Hartmann C., McLaughlin M.E., Batchelor T.T., Black P.M., von Deimling A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Louis D.N., "Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification.", *Cancer Res*. 63(7) (2003): 1602-7.
-

-
- [88] Ohgaki H., Dessen P., Jourde B., Horstmann S., Nishikawa T., Di Patre P.L., Burkhard C., Schuler D., Probst-Hensch N.M., Maiorka P.C., Barza N., Pisani P., Yonekawa Y., Yasargil M.G., Lutolf U.M., Kleihues P., "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study.", *Cancer Res.* 64(19) (2004): 6892-9.
- [89] Puri R.K., Leland P., Obiri N.I., Husain S.R., Kreitman R.J., Haas G.P., Pastan I., Debinski W., "Targeting of Interleukin-13 Receptor on Human Renal Cell Carcinoma Cells by a Recombinant Chimeric Protein Composed of Interleukin-13 and a Truncated Form of Pseudomonas Exotoxin A (PE38QQR)." *Blood.* 87(10) (1996): 4333-39.
- [90] Qiagen-Handbuch, "Critical Factors for Successful Real-Time PCR", Qiagen, Hilden, Deutschland (2006).
- [91] Qiagen-Handbuch, "RNeasy Lipid Tissue Handbook", Qiagen, Hilden, Deutschland (2006).
- [92] Rahaman S.O., Sharma P., Harbor P.C., Aman M.J., Vogelbaum M.A., Hague S.J., "IL-13R α 2, a decoy receptor for IL-13 acts as an inhibitor of IL-4-dependent signal transduction in glioblastoma cells." *Cancer Res.* 62(4) (2002): 1103-09.
- [93] Reifenberger G., Collins V.P., "Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas." *J Mol Med.* 82(10) (2004): 656-70.
- [94] Riemenschneider M.J., Koy T.H., Reifenberger G., "Expression of oligodendrocyte lineage genes in oligodendroglial and astrocytic gliomas.", *Acta Neuropathol.* 107(3) (2004): 277-82.
- [95] Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T., "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.", *Anal Biochem.* 245(2) (1997): 154-60.
- [96] Roa W., Brasher P.M., Bauman G., Authes M., Bruera E., Chan A., Fisher B., Fulton D., Gulavita S., Hao C., Husain S., Murtha A., Petruk K., Stewart D., Tai P., Urtasun R., Caircross J.G., Forsyth P., "Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial.", *J Clin Oncol* 22 (2004):1583–1588.
- [97] Sambrook J., Russel D.W., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", CSHL Press, New York, 2001.
- [98] Schulz W.A., "Molecular Biology of Human Cancers. An Advanced Student's Textbook.", Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.
- [99] Sehgal A., "Molecular Changes During the Genesis of Human Gliomas." (Review) *Semin Surg Oncol.* 14(1) (1998): 3-12.
-

-
- [100] Setoguchi T., Kondo T., "Nuclear export of OLIG2 in neuronal stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte differentiation.", *J Cell Biol.* 166(7) (2004): 963-68.
- [101] Stadler W.M., Steinberg G., Yang X., Hagos F., Turner C., Olopade O.I., „Alterations of the 9p21 and 9q33 Chromosomal Bands in Clinical Bladder Cancer Specimens by Fluorescence in Situ Hybridization.", *Clin Cancer Res.* 7(6) (2001): 1676-82.
- [102] Statistisches Bundesamt Wiesbaden: „Todesursachen in Deutschland – Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen 2007“ in: Fachserie 12 Reihe 4, Erscheinungsdatum: 26. August 2008, Artikel-Nr.: 2120400077005
- [103] Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T., Wiestler O.D., Zanella F., Reulen H.J., ALA-Glioma Study Group, "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial.", *Lancet Oncol* 7 (2006): 392–401.
- [104] Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M., Belanger K., Brandes A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E., Mirimanoff R.O., "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for patients with newlydiagnosed glioblastoma.", *N Engl J Med* 352 (2005): 987–996.
- [105] Tonn J.-C., Westphal M., Rutka J. T., Grossman S. A.: "Neuro-Oncology of CNS Tumors", Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006
- [106] Wada T., Berggren P., Steineck G., Adolfsson J., Wijkström H., Norming U., Hansson J., Hemminki K., Larsson P., "Bladder Neoplasms – Regions at Chromosome 9 with Putative Tumour Suppressor Genes.", *Scand J Urol Nephrol.* 37(2) (2003): 106-11.
- [107] Watanabe K., Sato K., Biernat W., Tachibana O., von Ammon K., Ogata N., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H., "Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies.", *Clin Cancer Res.* 3(4) (1997): 523-30.
- [108] Weitzner M.A., "Psychosocial and neuropsychiatric aspects of patients with primary brain tumors.", *Cancer Invest* 17 (1999): 285–297.
- [109] Weller M., Müller B., Koch R., Bamberg M., Krauseneck P., Neuro-Oncology Working Group of the German Cancer Society, "Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma." *J Clin Oncol.* 21(17) (2003): 3276-84.
-

-
- [110] Weller M.: "Interdisziplinäre S2 – Leitlinien für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters", W. Zuckschwerdt Verlag, 2004.
- [111] Wick A., Felsberg J., Steinbach J.P., Herrlinger U., Platten U., Blaschke B., Meyermann R., Reifenberger G., Weller M., Wick W., "Efficacy and tolerability of temozolomide in an one week on/one week off regimen in patients with recurrent glioma.", *J Clin Oncol* 25 (2007): 3357–3361.
- [112] Wick W., Menn O., Meisner C., Steinbach J., Hermisson M., Tatagiba M., Weller M., „Pharmacotherapy of epileptic seizures in glioma patients: who, when, why and how long?", *Onkologie* 28 (2005): 391–396.
- [113] Wong E.T., Hess K.R., Gleason M.J., Jaeckle K.A., Kyritsis A.P., Prados M.D., Levin V.A., Yung W.K., "Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials.", *J Clin Oncol.* 17(8) (1999):2572-2578.
- [114] Wright K.O., Messing E.M., Reeder J.E., "DBCCR1 mediates death in cultured bladder tumor cells.", *Oncogene.* 23(1) (2004): 82-90.
- [115] Wynn T.A., "IL-13 Effector Functions." (Review), *Annu Rev Immunol.* 21 (2003): 425-56.
- [116] Yokoo H., Nobusawa S., Takebayashi H., Ikenaka K., Isoda K., Kamiya M., Sasaki A., Hirato J., Nakazato Y., "Anti-Human Olig2 Antibody as a Useful Immunohistochemical Marker of Normal Oligodendrocytes and Gliomas.", *Am J Pathol.* 164(5) (2004): 1717-25.
- [117] Zhou Q., Wang S., Anderson D.J., "Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors.", *Neuron.* 25(2) (2000): 331-43.
- [118] Zhou Q., Choi G., Anderson D.J., "The bHLH Transcription Factor Olig2 Promotes Oligodendrocyte Differentiation in Collaboration with Nkx2.2.", *Neuron.* 31(5) (2001): 791-807.
- [119] Zhou Q., Anderson D.J., "The bHLH Transcription Factors OLIG2 and OLIG1 Couple Neuronal and Glial Subtype Specification.", *Cell.* 109(1) (2002): 61-73.
- [120] Zülch K.J.: "Histologic Typing of Tumors of the Central Nervous System. International Histological Classification of Tumors", no. 21. World Health Organisation: Geneva 1979
- [121] Zurawski S.M., Chomarat P., Djossou O., Bidaud C., McKenzie A.N., Miossec P., Banchereau J., Zurawski G., "The Primary Binding Subunit of the Human Interleukin-4 Receptor Is Also a Component of the Interleukin-13 Receptor." *J Biol Chem.* 270(23) (1995): 13869-78.
-

6. Tabellenanhang

Tabelle 1: Probenaufstellung inklusive isolierter Gesamt-RNA in µg

Proben-Nr.	Histologie	Geschlecht	Alter (Jahre)	Isolierte Gesamt-RNA in µg
67/02	DA	männlich	30	16,09
08/04	DA	weiblich	30	8,36
58/04	DA	männlich	6	24,12
11/05	DA	männlich	33	8,66
18/05	DA	männlich	33	7,35
45/06	DA	männlich	33	9,92
63/02	AA	weiblich	37	5,72
21/03	AA	männlich	38	7,55
37/03	AA	weiblich	50	25,36
65/03	AA	männlich	34	4,93
75/03	AA	männlich	42	11,75
96/03	AA	männlich	41	4,69
121/03	AA	männlich	67	12,70
137/03	AA	männlich	32	24,34
87/04	AA	weiblich	35	23,29
78/05	AA	männlich	41	12,88
89/05	AA	weiblich	38	48,04
37/02	GBM	weiblich	54	58,01
64/02	GBM	männlich	65	46,39
124/02	GBM	männlich	62	45,77
01/03	GBM	männlich	64	21,36
17/03	GBM	männlich	72	64,66
27/03	GBM	männlich	73	19,77
29/03	GBM	männlich	64	6,73
35/03	GBM	männlich	48	12,97
68/03	GBM	männlich	79	11,04
76/03	GBM	männlich	66	10,64
103/03	GBM	männlich	49	8,47
03/04	GBM	männlich	52	7,50
60/04	GBM	weiblich	68	40,34
10/05	GBM	weiblich	69	91,20
44/05	GBM	weiblich	74	11,00
74/05	GBM	weiblich	72	9,47
79/05	GBM	männlich	63	31,04
80/05	GBM	weiblich	60	35,74
83/05	GBM	männlich	76	25,29
103/05	GBM	männlich	69	70,90
119/05	GBM	weiblich	24	15,34
33/06	GBM	männlich	57	55,41
51/06	GBM	männlich	50	4,00
28/03	rGBM	weiblich	49	53,92
36/03	rGBM	männlich	67	41,80
51/03	rGBM	männlich	64	11,20
54/03	rGBM	männlich	61	9,50
74/03	rGBM	männlich	64	15,10
152/03	rGBM	weiblich	43	21,98
153/03	rGBM	männlich	54	69,90
47/04	rGBM	männlich	42	21,00
76/04	rGBM	männlich	62	20,12
04/05	rGBM	weiblich	64	15,09
29/06	rGBM	männlich	61	36,22

Tabelle 2: Ergebnisse und Auswertung der Real-Time PCR für IL13Rα2

Proben-Nr.	CT β-Actin	CT Mittelwert β-Actin	CT IL13Rα2	CT Mittelwert IL13Rα2	Δ CT	ΔΔ CT	relative IL13Rα2 Expression
Reference	14,79 14,72 14,62	14,7100	19,90 19,49 20,60	19,9967	5,2867	0,0000	1,0000
67/02	15,61 15,78 15,95	15,7800	26,19 26,33 25,80	26,1067	10,3267	5,0400	0,0304
08/04	17,06 16,92 17,05	17,0100	25,11 24,32 23,94	24,4567	7,4467	2,1600	0,2238
58/04	15,28 15,66 15,63	15,5233	26,60 26,77 26,31	26,5600	11,0367	5,7500	0,0186
11/05	16,06 16,02 16,95	16,3433	29,43 30,25 27,01	28,8967	12,5533	7,2667	0,0065
18/05	19,17 19,34 19,97	19,4933	22,22 19,11 23,08	21,4700	1,9767	-3,3100	9,9177
45/06	17,99 18,27 18,03	18,0967	24,69 24,39 24,68	24,5867	6,4900	1,2033	0,4343
63/02	16,53 17,35 18,78	17,5533	21,43 22,12 22,51	22,0200	4,4667	-0,8200	1,7654
21/03	19,16 20,13 20,66	19,9833	17,46 20,18 18,27	18,6367	-1,3467	-6,6333	99,2733
37/03	19,75 16,81 20,34	18,9667	23,40 19,99 23,55	22,3133	3,3467	-1,9400	3,8371
65/03	20,18 20,26 19,33	19,9233	21,48 20,45 21,99	21,3067	1,3833	-3,9033	14,9631
75/03	18,92 18,68 19,06	18,8867	24,27 22,33 23,06	23,2200	4,3333	-0,9533	1,9363
96/03	17,75 17,71 17,15	17,5367	23,58 24,84 20,53	22,9833	5,4467	0,1600	0,8950
121/03	15,31 15,53 15,44	15,4267	27,66 27,88 27,36	27,6333	12,2067	6,9200	0,0083
137/03	21,25 20,12 21,89	21,0867	24,22 25,77 23,97	24,6533	3,5667	-1,7200	3,2944
87/04	15,66 15,93 15,75	15,7800	25,60 25,14 25,64	25,4600	9,6800	4,3933	0,0476
78/05	16,33 16,76 17,41	16,8333	20,97 25,33 24,72	23,6733	6,8400	1,5533	0,3407
89/05	15,12 15,23 15,36	15,2367	23,96 25,80 23,67	24,4767	9,2400	3,9533	0,0646
37/02	18,61 18,28 17,97	18,2867	21,59 18,38 18,39	19,4533	1,1667	-4,1200	17,3878
64/02	17,29 16,72 16,83	16,9467	20,69 16,29 21,94	19,6400	2,6933	-2,5933	6,0349
124/02	15,59 17,15 17,21	16,6500	22,77 23,90 29,31	25,3267	8,6767	3,3900	0,0954
01/03	18,19 18,94 19,07	18,7333	24,25 22,56 20,27	22,3600	3,6267	-1,6600	3,1602
17/03	15,68 15,68 16,01	15,7900	20,16 20,75 20,24	20,3833	4,5933	-0,6933	1,6170
27/03	17,26 17,43 17,70	17,4633	22,63 22,20 22,44	22,4233	4,9600	-0,3267	1,2541
29/03	20,45 22,13 18,85	20,4767	24,71 23,13 23,17	23,6700	3,1933	-2,0933	4,2673

35/03	17,44 18,53 18,46	18,1433	23,31 22,94 22,66	22,9700	4,8267	-0,4600	1,3755
68/03	17,22 17,40 17,76	17,4600	23,24 23,23 24,10	23,5233	6,0633	0,7767	0,5837
76/03	19,51 19,78 19,79	19,6933	27,16 26,75 27,06	26,9900	7,2967	2,0100	0,2483
103/03	17,41 16,95 17,41	17,2567	20,46 21,81 22,27	21,5133	4,2567	-1,0300	2,0420
03/04	15,85 16,11 16,13	16,0300	22,46 22,77 24,06	23,0967	7,0667	1,7800	0,2912
60/04	15,85 15,57 15,84	15,7533	24,16 23,55 24,10	23,9367	8,1833	2,8967	0,1343
10/05	18,02 18,01 17,99	18,0050	19,55 18,24 20,02	19,2700	1,2650	-4,0217	16,2421
44/05	16,08 16,11 16,01	16,0667	19,14 20,43 20,30	19,9567	3,8900	-1,3967	2,6329
74/05	17,70 18,08 18,29	18,0233	22,40 23,08 21,04	22,1733	4,1500	-1,1367	2,1987
79/05	15,17 15,21 15,28	15,2200	22,03 22,40 22,08	22,1700	6,9500	1,6633	0,3157
80/05	17,00 16,70 17,33	17,0100	23,71 23,15 24,34	23,7333	6,7233	1,4367	0,3694
83/05	16,26 16,28 16,36	16,3000	21,29 21,94 21,47	21,5667	5,2667	-0,0200	1,0140
103/05	17,50 17,67 17,75	17,6400	24,47 23,70 24,91	24,3600	6,7200	1,4333	0,3703
119/05	15,75 15,61 16,05	15,8033	22,09 20,65 20,08	20,9400	5,1367	-0,1500	1,1096
33/06	15,26 15,87 16,00	15,7100	21,00 21,38 21,44	21,2733	5,5633	0,2767	0,8255
51/06	16,21 16,40 16,31	16,3050	22,77 22,76 22,77	22,7650	6,4600	1,1733	0,4434
28/03	16,81 16,92 17,20	16,9767	26,06 26,20 26,07	26,1100	9,1333	3,8467	0,0695
36/03	17,61 17,47 17,33	17,4700	23,17 23,12 23,22	23,1700	5,7000	0,4133	0,7509
51/03	16,17 16,10 16,22	16,1633	27,01 27,13 27,32	27,1533	10,9900	5,7033	0,0192
54/03	17,80 17,82 17,61	17,7433	28,95 27,02 27,76	27,9100	10,1667	4,8800	0,0340
74/03	15,91 15,75 15,60	15,7533	24,69 24,50 24,86	24,6833	8,9300	3,6433	0,0800
152/03	17,78 18,13 18,30	18,0700	24,96 24,82 25,59	25,1233	7,0533	1,7667	0,2939
153/03	16,01 16,03 16,02	16,0200	24,05 25,82 23,94	24,6033	8,5833	3,2967	0,1018
47/04	16,43 16,88 17,86	17,0567	23,70 21,66 24,10	23,1533	6,0967	0,8100	0,5704
76/04	16,12 16,25 16,36	16,2433	22,87 35,12 24,36	27,4500	11,2067	5,9200	0,0165
04/05	16,90 16,52 16,96	16,7933	28,30 28,57 28,89	28,5867	11,7933	6,5067	0,0110
29/06	15,63 15,99 15,61	15,7433	26,70 26,99 26,62	26,7700	11,0267	5,7400	0,0187

Tabelle 3: Ergebnisse und Auswertung der Real-Time PCR für OLIG2

Proben-Nr.	CT GAPDH	CT Mittelwert GAPDH	CT OLIG2	CT Mittelwert OLIG2	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	relative OLIG2 Expression
Reference	23,70 18,39 18,27	20,1200	23,98 21,15 22,73	22,6200	2,5000	0,0000	1,0000
67/02	16,34 16,25 16,40	16,3300	24,12 25,02 25,14	24,7600	8,4300	5,9300	0,0164
08/04	17,90 18,09 18,07	18,0200	25,61 25,08 23,32	24,6700	6,6500	4,1500	0,0563
58/04	16,49 16,59 16,59	16,5567	24,39 24,40 22,97	23,9200	7,3633	4,8633	0,0344
11/05	16,69 17,29 17,17	17,0500	25,29 27,78 26,23	26,4333	9,3833	6,8833	0,0085
18/05	17,74 16,87 17,45	17,3533	23,95 25,23 25,08	24,7533	7,4000	4,9000	0,0335
45/06	17,08 17,17 17,48	17,2433	24,07 24,24 24,21	24,1733	6,9300	4,4300	0,0464
63/02	15,72 16,06 16,29	16,0233	23,47 22,74 23,25	23,1533	7,1300	4,6300	0,0404
21/03	18,16 18,03 18,13	18,1067	24,40 23,74 25,02	24,3867	6,2800	3,7800	0,0728
37/03	17,20 18,41 18,02	17,8767	23,62 23,79 23,93	23,7800	5,9033	3,4033	0,0945
65/03	18,81 18,89 19,04	18,9133	25,73 25,27 25,83	25,6100	6,6967	4,1967	0,0545
75/03	20,07 19,67 19,82	19,8533	25,65 21,89 25,69	24,4100	4,5567	2,0567	0,2404
96/03	18,12 18,04 18,34	18,1667	24,11 24,09 23,36	23,8533	5,6867	3,1867	0,1098
121/03	16,02 16,11 16,22	16,1167	26,36 27,13 27,34	26,9433	10,8267	8,3267	0,0031
137/03	18,82 18,92 19,14	18,9600	27,27 27,39 27,30	27,3200	8,3600	5,8600	0,0172
87/04	16,82 17,10 17,08	17,0000	20,69 21,01 22,38	21,3600	4,3600	1,8600	0,2755
78/05	15,51 15,72 15,44	15,5567	21,84 22,16 21,92	21,9733	6,4167	3,9167	0,0662
89/05	17,45 17,28 17,35	17,3600	21,61 21,86 20,60	21,3567	3,9967	1,4967	0,3544
37/02	16,49 16,24 16,75	16,4933	25,62 24,59 25,49	25,2333	8,7400	6,2400	0,0132
64/02	15,86 15,95 16,11	15,9733	26,12 27,14 26,90	26,7200	10,7467	8,2467	0,0033
124/02	15,37 15,44 15,80	15,5367	23,85 24,23 25,23	24,4367	8,9000	6,4000	0,0118
01/03	17,12 17,24 17,02	17,1267	28,22 27,63 28,91	28,2533	11,1267	8,6267	0,0025
17/03	15,47 15,38 15,72	15,5233	26,82 26,40 26,76	26,6600	11,1367	8,6367	0,0025
27/03	16,08 16,10 16,19	16,1233	24,12 24,13 24,20	24,1500	8,0267	5,5267	0,0217
29/03	16,03 15,82 16,45	16,1000	23,64 25,46 26,06	25,0533	8,9533	6,4533	0,0114

35/03	16,69 16,28 17,11	16,6933	25,34 25,40 25,19	25,3100	8,6167	6,1167	0,0144
68/03	16,26 16,49 16,76	16,5033	24,98 25,09 25,26	25,1100	8,6067	6,1067	0,0145
76/03	19,69 20,07 20,02	19,9267	25,09 25,95 25,36	25,4667	5,5400	3,0400	0,1216
103/03	16,39 16,47 16,25	16,3700	25,18 25,28 25,49	25,3167	8,9467	6,4467	0,0115
03/04	15,47 15,78 15,60	15,6167	22,50 22,68 23,05	22,7433	7,1267	4,6267	0,0405
60/04	14,87 14,80 15,05	14,9067	20,27 20,45 20,24	20,3200	5,4133	2,9133	0,1327
10/05	17,30 17,11 17,02	17,1433	24,14 23,86 22,99	23,6633	6,5200	4,0200	0,0616
44/05	17,78 17,84 17,94	17,8533	28,19 26,90 27,16	27,4167	9,5633	7,0633	0,0075
74/05	17,50 17,51 17,33	17,4467	23,40 25,43 25,73	24,8533	7,4067	4,9067	0,0333
79/05	14,40 14,43 14,52	14,4500	24,75 24,12 24,44	24,4367	9,9867	7,4867	0,0056
80/05	15,77 16,09 15,98	15,9467	23,16 23,48 23,44	23,3600	7,4133	4,9133	0,0332
83/05	16,86 16,91 17,16	16,9767	25,37 26,70 25,96	26,0100	9,0333	6,5333	0,0108
103/05	15,95 16,03 15,99	15,9900	23,44 23,07 23,23	23,2467	7,2567	4,7567	0,0370
119/05	14,58 14,68 14,65	14,6367	21,16 20,64 21,81	21,2033	6,5667	4,0667	0,0597
33/06	14,67 14,86 15,06	14,8633	22,99 23,14 23,16	23,0967	8,2333	5,7333	0,0188
51/06	14,76 14,72 14,74	14,7400	24,01 24,38 24,20	24,1950	9,4550	6,9550	0,0081
28/03	19,21 19,12 19,78	19,3700	30,81 29,48 30,06	30,1167	10,7467	8,2467	0,0033
36/03	16,60 16,75 17,14	16,8300	24,58 24,44 24,29	24,4367	7,6067	5,1067	0,0290
51/03	18,47 18,49 18,57	18,5100	28,98 28,37 27,43	28,2600	9,7500	7,2500	0,0066
54/03	18,35 18,35 18,24	18,3133	29,75 30,21 29,65	29,8700	11,5567	9,0567	0,0019
74/03	16,47 16,50 16,47	16,4800	25,74 25,67 25,14	25,5167	9,0367	6,5367	0,0108
152/03	19,06 18,77 18,58	18,8033	26,73 25,33 26,05	26,0367	7,2333	4,7333	0,0376
153/03	16,56 16,79 17,09	16,8133	25,14 24,58 24,18	24,6333	7,8200	5,3200	0,0250
47/04	17,53 17,63 17,95	17,7033	27,33 28,11 28,26	27,9000	10,1967	7,6967	0,0048
76/04	17,20 17,31 17,27	17,2600	29,38 30,28 29,82	29,8267	12,5667	10,0667	0,0009
04/05	16,33 16,36 16,40	16,3633	26,44 27,56 27,17	27,0567	10,6933	8,1933	0,0034
29/06	16,20 16,23 15,98	16,1367	21,21 20,94 20,93	21,0267	4,8900	2,3900	0,1908

Tabelle 4: Ergebnisse und Auswertung der Real-Time PCR für DBCCR1

Proben-Nr.	CT β -Actin	CT Mittelwert β -Actin	CT DBCCR1	CT Mittelwert DBCCR1	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	relative DBCCR1 Expression
Reference	14,39	14,4567	19,12	19,3233	4,8667	0,0000	1,0000
	14,50		19,09				
	14,48		19,76				
67/02	16,94	17,3267	22,41	22,5033	5,1767	0,3100	0,8066
	17,39		22,32				
	17,65		22,78				
08/04	16,44	17,7233	23,51	23,6900	5,9667	1,1000	0,4665
	18,56		24,37				
	18,17		23,19				
58/04	16,27	16,6433	22,87	23,1433	6,5000	1,6333	0,3223
	16,92		23,16				
	16,74		23,40				
11/05	14,42	15,4933	23,12	24,4367	8,9433	4,0767	0,0593
	15,97		24,67				
	16,09		25,52				
18/05	19,40	19,2767	26,66	26,1500	6,8733	2,0067	0,2488
	19,35		25,92				
	19,08		25,87				
45/06	18,20	17,9967	25,01	24,5900	6,5933	1,7267	0,3021
	18,12		24,40				
	17,67		24,36				
63/02	16,98	17,6633	24,29	24,7733	7,1100	2,2433	0,2112
	18,12		24,41				
	17,89		25,62				
21/03	21,48	21,5133	25,02	25,1033	3,5900	-1,2767	2,4228
	21,62		24,95				
	21,44		25,34				
37/03	20,74	19,5800	26,30	26,9433	7,3633	2,4967	0,1772
	18,97		27,50				
	19,03		27,03				
65/03	20,49	20,5333	25,05	24,4600	3,9267	-0,9400	1,9185
	20,55		23,39				
	20,56		24,94				
75/03	19,83	19,5433	22,41	23,0033	3,4600	-1,4067	2,6512
	20,20		22,86				
	18,60		23,74				
96/03	18,56	18,2100	25,30	24,6933	6,4833	1,6167	0,3261
	17,51		24,56				
	18,56		24,22				
121/03	15,48	15,8400	27,02	27,3300	11,4900	6,6233	0,0101
	16,44		27,33				
	15,60		27,64				
137/03	20,17	19,9567	25,14	25,3133	5,3567	0,4900	0,7120
	20,09		24,86				
	19,61		25,94				
87/04	16,64	16,8167	21,38	21,9433	5,1267	0,2600	0,8351
	17,35		21,08				
	16,46		23,37				
78/05	16,69	16,7900	23,06	23,4200	6,6300	1,7633	0,2946
	16,98		24,09				
	16,70		23,11				
89/05	15,42	15,6767	22,56	22,6433	6,9667	2,1000	0,2333
	15,47		23,13				
	16,14		22,24				
37/02	18,18	18,2900	27,27	27,4033	9,1133	4,2467	0,0527
	18,52		28,25				
	18,17		26,69				
64/02	16,65	17,6567	27,17	26,4467	8,7900	3,9233	0,0659
	17,97		25,02				
	18,35		27,15				
124/02	17,65	17,6033	24,85	25,4900	7,8867	3,0200	0,1233
	17,41		26,38				
	17,75		25,24				
01/03	19,29	19,3167	27,06	26,2467	6,9300	2,0633	0,2393
	19,24		26,21				
	19,42		25,47				
17/03	15,33	15,3900	23,26	23,4767	8,0867	3,2200	0,1073
	15,32		23,82				
	15,52		23,35				
27/03	17,12	17,2033	22,11	22,1567	4,9533	0,0867	0,9417
	17,14		22,01				
	17,35		22,35				
29/03	20,72	19,8733	23,59	24,3400	4,4667	-0,4000	1,3195
	18,27		24,57				
	20,63		24,86				

35/03	17,97 18,01 17,91	17,9633	23,93 23,54 23,89	23,7867	5,8233	0,9567	0,5152
68/03	17,00 17,28 17,37	17,2167	23,01 23,05 22,63	22,8967	5,6800	0,8133	0,5691
76/03	20,56 20,11 20,56	20,4100	23,36 22,59 22,12	22,6900	2,2800	-2,5867	6,0071
103/03	17,32 17,23 17,15	17,2333	24,20 24,93 25,01	24,7133	7,4800	2,6133	0,1634
03/04	16,35 15,71 16,06	16,0400	22,75 22,80 22,79	22,7800	6,7400	1,8733	0,2729
60/04	15,48 15,33 15,54	15,4500	25,63 25,21 26,13	25,6567	10,2067	5,3400	0,0247
10/05	18,23 18,12 18,01	18,1200	28,30 27,33 26,58	27,4033	9,2833	4,4167	0,0468
44/05	17,31 17,28 17,18	17,2567	21,10 22,47 24,15	22,5733	5,3167	0,4500	0,7320
74/05	18,31 18,53 18,07	18,3033	24,97 24,81 26,49	25,4233	7,1200	2,2533	0,2097
79/05	15,66 15,21 15,28	15,3833	24,65 23,15 24,24	24,0133	8,6300	3,7633	0,0736
80/05	16,63 17,19 16,85	16,8900	24,62 24,92 25,05	24,8633	7,9733	3,1067	0,1161
83/05	17,18 17,42 16,77	17,1233	24,88 23,41 24,38	24,2233	7,1000	2,2333	0,2127
103/05	17,20 17,18 17,25	17,2100	24,90 25,47 25,59	25,3200	8,1100	3,2433	0,1056
119/05	15,36 15,48 15,63	15,4900	21,71 21,43 21,70	21,6133	6,1233	1,2567	0,4185
33/06	14,96 15,02 15,66	15,2133	24,18 25,95 25,31	25,1467	9,9333	5,0667	0,0298
51/06	15,87 16,08 15,96	15,9750	25,44 24,92 25,18	25,1800	9,2050	4,3383	0,0494
28/03	16,65 16,08 16,80	16,5100	27,27 27,30 28,03	27,5333	11,0233	6,1567	0,0140
36/03	17,30 17,71 17,22	17,4100	22,45 22,40 22,64	22,4967	5,0867	0,2200	0,8586
51/03	18,07 17,47 17,23	17,5900	24,13 22,29 23,38	23,2667	5,6767	0,8100	0,5704
54/03	19,06 19,10 19,39	19,1833	24,32 24,31 23,45	24,0267	4,8433	-0,0233	1,0163
74/03	16,10 16,63 16,37	16,3667	24,09 22,76 22,99	23,2800	6,9133	2,0467	0,2420
152/03	20,41 16,99 18,72	18,7067	25,36 21,08 23,33	23,2567	4,5500	-0,3167	1,2454
153/03	16,96 16,25 17,45	16,8867	25,39 24,45 25,24	25,0267	8,1400	3,2733	0,1034
47/04	19,08 16,24 18,25	17,8567	24,72 23,76 25,54	24,6733	6,8167	1,9500	0,2588
76/04	17,61 17,65 17,50	17,5867	22,38 22,20 22,38	22,3200	4,7333	-0,1333	1,0968
04/05	16,37 17,01 17,11	16,8300	21,44 21,01 22,44	21,6300	4,8000	-0,0667	1,0473
29/06	15,62 15,75 15,59	15,6533	24,68 25,69 24,76	25,0433	9,3900	4,5233	0,0435

7. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Damen/Herren:

Adamkiewicz	Hofmann	Radsak
Arnold	Hoyer	Remschmidt
Aumüller		Renz
	Jungclas	Richter
Basler		Riera
Baum	Kalder	Röhm
Becker	Kill	Röper
Bertalanffy	Klenk	Rosenow
Bien	Klose	Rothmund
Boudriot	Koch	
	Köhler	Schäfer
Cetin	Koolman	Schmidt
Christiansen	Krause	Schnabel
Czubayko	Krieg	Schneider
	Kroll	Schrader
Daut	Kuhlmann	Seitz
		Sommer
Eilers	Lang	Steiniger
	Lenz	Strauch
Feuser	Lill	Sure
Folz	Löffler	
Fuchs	Lohoff	Vogelmeier
Gerdes	Maier	Wagner
Göke	Maisch	Weihe
Görg	Mandrek	Weiler
Gotzen	Moll	Werner
Griss	Moosdorf	Westermann
Grundmann	Mueller	Wollenberg
Grzeschik	Müller	Wulf
Gudermann	Mutters	
Hamer	Neubauer	
Hasilik		
Hertl	Oertel	
Herrmann-Lingen		

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die auf die unterschiedlichste Art und Weise zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt ...

- ... Herrn Dr. med. Oliver Bozinov für die freundliche Bereitstellung des Themas, sowie die hervorragende fachliche und persönliche Betreuung im Rahmen der Dissertation und darüber hinaus. Danke Oliver!
- ... Herrn Prof. Dr. med. Helmut Bertalanffy für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung anfertigen zu dürfen.
- ... Frau Sylvia Köhler ohne deren großartige Vorarbeit und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
- ... Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Sure für die wertvollen Ratschläge und die freundliche Überlassung des Bildmaterials.
- ... Frau Dr. med. Julia Henzgen für die gute und zuverlässige Zusammenarbeit im Labor und die produktiven Diskussionen.
- ... Herrn Prof. Dr. med. Andreas Neubauer, Herrn PD Dr. med. Markus Ritter und Frau Dagmar Schwell aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie für die hilfreichen Ratschläge und die freundliche Bereitstellung der Gerätschaften.
- ... Herrn Prof. Dr. med. Axel Pagenstecher und Herrn Peter Rexin aus der Abteilung für Neuropathologie für die Überprüfung der histopathologischen Diagnosen und die Bereitstellung des Bildmaterials.

Insbesondere danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die vielfältige und unersetzbare Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir geben.

Herrn Torsten Rittweiler, Herrn Boris Plümpe und Frau Lisa Sahner, sowie meinen weiteren Freunden und Wegbegleitern während meiner Studienzeit danke ich für die vielen interessanten Begegnungen, die offenen Ohren, die aufmunternden Worte zur rechten Zeit und die schönen Jahre in Marburg.

In Gedenken an Claus Hellhammer (27.09.1980 – 01.06.2009)
